

Untersuchungen zum Aufbau, zur Funktion und zur Verbreitung von genomischen Inseln in der Gattung *Legionella*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doktor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Biol. Monika Lautner

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. Stefan Hecht

Gutachter/innen: 1. PD Dr. Klaus Heuner
2. Prof. Dr. Thomas Eitinger
3. Prof. Dr. Antje Flieger

Tag der mündlichen Prüfung: 06. Februar 2013

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	5
Summary	7
1 Einleitung	8
1.1 Der Genus <i>Legionella</i>	8
1.2 Biologie und Vorkommen von <i>L. pneumophila</i>	8
1.3 <i>Legionella</i> als Krankheitserreger	9
1.3.1 Legionellose.....	9
1.3.2 Diagnostik und Therapie	10
1.4 <i>L. pneumophila</i>: ein intrazellulärer Erreger.....	11
1.4.1 Die Replikation in eukaryotischen Zellen	11
1.4.2 Der biphasische Lebenszyklus	12
1.5 Virulenzfaktoren bei <i>L. pneumophila</i>	14
1.5.1 Sekretionssysteme.....	14
1.5.1.1 Sec und Tat Translokation	15
1.5.1.2 Das putative Typ I Sekretionssystem	15
1.5.1.3 Das Typ II Sekretionssystem	16
1.5.1.4 Typ IV Sekretionssysteme	17
1.5.1.5 Das putative Typ V Sekretionssystem	20
1.5.2 Oberflächenproteine und –strukturen	20
1.5.2.1 Die Peptidylpropyl cis-trans Isomerase Mip	20
1.5.2.2 Lipopolysaccharide	21
1.5.2.3 Flagelle und Pili	21
1.6 <i>Legionella</i> „Genomics“	22
1.7 Merkmale und Bedeutung genomischer Elemente	24
1.8 Die Mechanismen des horizontalen Gentransfers.....	26
1.9 Rekombinasen	27
1.9.1 Tyrosin Rekombinasen.....	27
1.9.2 Serin Rekombinasen	30

1.10	Zielsetzung der Arbeit.....	31
2	Material und Methoden.....	33
2.1	Material.....	33
2.1.1	Bakterienstämme	33
2.1.1.1	Legionella	33
2.1.1.2	Escherichia.....	34
2.1.2	Infektionsmodelle.....	34
2.1.3	Vektoren	34
2.1.4	Rekombinante Plasmide.....	35
2.1.5	Oligonukleotide	36
2.1.6	Chemikalien.....	40
2.1.7	Medien, Nährböden und Medienzusätze.....	41
2.1.7.1	Kultivierung von E. coli	41
2.1.7.2	Kultivierung von Legionella	42
2.1.7.3	Kultivierung von U-937 Zellen	42
2.1.7.4	Kultivierung von Acanthamoeba castellanii	43
2.1.7.5	Antibiotika und andere Medienzusätze.....	43
2.1.8	Enzyme	44
2.1.9	Laborkits.....	44
2.1.10	DNA Größenstandard	45
2.1.11	Geräte.....	45
2.2	Methoden.....	47
2.2.1	Kultivierung und Konservierung von Bakterien.....	47
2.2.1.1	Kultivierung von E. coli	47
2.2.1.2	Kultivierung von Legionella	47
2.2.1.3	Anlegen von Glycerinkulturen	47
2.2.2	Nukleinsäure Techniken	48
2.2.2.1	Isolierung chromosomaler DNA aus Bakterien für die PCR.....	48
2.2.2.2	Isolierung chromosomaler DNA aus Bakterien für die Real-time PCR	48
2.2.2.3	Isolierung von Plasmid DNA aus E .coli.....	49
2.2.2.4	Isolierung von Gesamt-RNA aus Bakterien.....	50
2.2.2.5	DNase I Verdau von RNA	50
2.2.2.6	Aufreinigung von RNA	50
2.2.2.7	Die Polymerase Kettenreaktion (PCR)	51
2.2.2.8	Aufkoch-PCR	52
2.2.2.9	Inverse-PCR	53

2.2.2.10	Sequenzierungs-PCR.....	53
2.2.2.11	cDNA Synthese	54
2.2.2.12	Real-time PCR (qPCR)	55
2.2.2.13	Horizontale Agarose-Gelelektrophorese	56
2.2.2.14	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel	57
2.2.2.15	DNA-Fällung.....	57
2.2.2.16	Aufreinigung von DNA aus PCR und Restriktionssverdau.....	57
2.2.2.17	DNA-Restriktion.....	58
2.2.2.18	Ligation eines Inserts in einen Vektor.....	58
2.2.2.19	Religation.....	59
2.2.2.20	Generierung einer Deletionsmutante bei <i>L. pneumophila</i>	60
2.2.3	Transformation von Bakterien.....	61
2.2.3.1	Herstellung von elektrokompetenten <i>E. coli</i>	61
2.2.3.2	Herstellung von elektrokompetenten <i>L. pneumophila</i>	61
2.2.3.3	Transformation durch Elektroporation.....	61
2.2.3.4	Natürliche Transformation von <i>L. pneumophila</i> Corby	62
2.2.3.5	Konjugation	62
2.2.4	<i>In vivo</i> Experimente.....	63
2.2.4.1	Coinfektion (72 h) von <i>A. castellanii</i> mit <i>L. pneumophila</i>	63
2.2.4.2	Coinfektion (21 d) von <i>A. castellanii</i> mit <i>L. pneumophila</i>	64
2.2.4.3	<i>L. pneumophila</i> „Competition“ in <i>A. castellanii</i>	65
2.2.4.4	Coinfektion von <i>A. castellanii</i> mit <i>L. pneumophila</i> zur Isolierung chromosomaler DNA.....	66
2.2.4.5	Coinfektion von U-937 Zellen mit <i>Legionella</i>	66
2.2.5	<i>In Silico</i> Analyse	68
3	Ergebnisse.....	69
3.1	Funktion und Regulation von Trb-1 bei <i>L. pneumophila</i> Corby	69
3.1.1	Die Funktion der Integrase bei der Bildung der episomalen Form von Trb-1	69
3.1.2	Der Einfluss der Integrase auf die Konjugation von Trb-1	71
3.1.3	Regulation der genomischen Insel Trb-1 bei <i>L. pneumophila</i> Corby	74
3.1.3.1	Molekularbiologische Untersuchungen zur Regulation von Trb-1: <i>in vitro</i>	74
3.1.3.2	Molekularbiologische Untersuchung zur Regulation von Trb-1: <i>in vivo</i>	77
3.1.4	Untersuchung zur Expression der Trb-1 codierten Gene.....	78
3.1.5	Die Bedeutung von Trb-1 für die Virulenz von <i>Legionella</i>	81
3.1.5.1	Der Einfluss von Trb-1 auf die Virulenz von <i>L. pneumophila</i> Corby	81
3.1.5.2	Der Einfluss von Trb-1 auf die Virulenz von <i>L. oakridgensis</i>	83
3.1.6	Die Verbreitung von Trb-1 in der Gattung <i>Legionella</i>	87

3.2	Charakterisierung von LpcGI-2 bei <i>L. pneumophila</i> Corby	90
3.2.1	Die Analyse von LpcGI-2	90
3.2.2	Die Funktion der Integrasen bei der Bildung der episomalen Formen von LpcGI-2	97
3.2.3	Der Einfluss von Integrase und PilT auf die Konjugation	101
3.2.4	Die Bedeutung von LpcGI-2 für die Virulenz von <i>L. pneumophila</i> Corby	107
3.2.5	Die Verbreitung der genomischen Insel LpcGI-2 in der Gattung <i>Legionella</i>	108
3.3	Charakterisierung von LpcGI-1, LpcGI-Asn und LpcGI-Phe bei <i>L. pneumophila</i> Corby	112
3.3.1	Die Analyse von LpcGI-1	112
3.3.2	Die Analyse von LpcGI-Asn	117
3.3.3	Die Analyse von LpcGI-Phe	120
4	Diskussion	123
4.1	Die Analyse der genomischen Insel Trb-1	123
4.1.1	Die Exzision und Konjugation von Trb-1 sind Integrase abhängig	123
4.1.2	Die Funktion der <i>Legionella vir</i> Region	127
4.1.3	Die Bedeutung von Trb-1 für die Fitness von <i>L. pneumophila</i> Corby	130
4.1.4	Trb-1 ist in der Gattung <i>Legionella</i> verbreitet	132
4.2	Die genomische Insel LpcGI-2	136
4.2.1	Integration und Exzision von LpcGI-2	136
4.2.2	LpcGI-2 codiert für ein neues und funktionelles T4SS	141
4.2.3	Die Bedeutung von LpcGI-2 für die Fitness von <i>L. pneumophila</i> Corby	145
4.2.4	LpcGI-2 ähnliche genomische Inseln sind in der Gattung <i>Legionella</i> verbreitet	147
4.3	<i>L. pneumophila</i> Corby codiert für sechs genomische Inseln	152
4.3.1	Die genomischen Insel LpcGI-1	152
4.3.2	Die genomische Insel LpcGI-Asn	156
4.3.3	Die genomische Insel LpcGI-Phe	159
4.4	Ausblick	161
	Literaturverzeichnis	163
	Anhang	175
	Abkürzungsverzeichnis	187
	Publikationsliste	189
	Danksagung	190
	Erklärung	191

Zusammenfassung

Der Austausch von genetischem Material über horizontalen Gentransfer, stellt einen wichtigen Mechanismus in der bakteriellen Evolution dar. *Legionella pneumophila* Stämme codieren für verschiedene Typ IV Sekretionssysteme (T4SS) und integrative konjugative Elemente, die zur genomischen Variabilität der intrazellulären Erreger beitragen.

L. pneumophila Corby codiert auf der genomischen Insel Trb-1 für ein funktionelles Konjugations- und T4ASS. Trb-1 ist innerhalb des tRNA^{Pro} Gens integriert und kann in einer chromosomalen oder zirkulären episomalen Form existieren. Zusätzlich zu den *trb/tra* Genen sind auf der Insel eine Integrase (*int-1*) und die Gene *lvrRABC* der *Legionella vir* Region (*lvr*) lokalisiert. Durch die Deletion von *int-1* konnte gezeigt werden, dass die Exzision von Trb-1 unter Beteiligung der Integrase erfolgt. Zudem wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal demonstriert, dass die *lvr*-Region, vor allem der putative Phagen-Repressor LvrR an der Regulation der Exzision von Trb-1 beteiligt ist. Die Konjugation von Trb-1 in *L. oakridgensis*, hatte keinen Effekt auf die *in vivo* Fitness der Transkonjuganten in humanen Makrophagen.

Die genomischen Inseln LpcGI-1 und LpcGI-2 codieren für ein neues putatives GI-T4SS. Für LpcGI-2 konnte erstmals gezeigt werden, dass das T4SS funktionell ist und die Konjugation der genomischen Insel in einen anderen *L. pneumophila* Stamm vermitteln kann. LpcGI-2 kann anschließend ortsspezifisch in das Genom der Transkonjuganten integriert werden. LpcGI-1 und LpcGI-2 werden vom tRNA^{Thr} bzw. tRNA^{Met} Gen flankiert und können in verschiedenen chromosomalen und zirkulären, episomalen Formen existieren. Die Exzision von LpcGI-2 erfolgt ähnlich zu Trb-1, in Abhängigkeit einer ortsspezifischen Integrase.

Im Genom von *Lp* Corby wurden zwei weitere genomische Inseln (LpcGI-Asn und LpcGI-Phe) identifiziert. *In silico* Analysen zeigten zudem, dass genomische Inseln mit einer Ähnlichkeit zu Trb-1, LpcGI-2 bzw. LpcGI-1 im Genus *Legionella* verbreitet sind.

Schlagworte: *Legionella*, Typ IV Sekretionssystem, Konjugation, genomische Insel, Integrase

Summary

Exchange of genetic information by horizontal gene transfer is an important mechanism for the evolution of bacterial genomes. *Legionella pneumophila* strains encode different type IV secretion systems and integrative conjugative elements contribute to the variability of the intracellular pathogen.

The genomic island Trb-1 of *L. pneumophila* Corby encodes a functional conjugation and T4ASS. Trb-1 is integrated within the tRNA^{Pro} gene and can exist in a chromosomal or an episomal circular form. In addition to the *trb/tra* genes, a site-specific integrase (*int-1*) and a *Legionella vir* region (*lvrRABC*) are also localized on the genomic island. By deleting the *int-1* gene, it could be demonstrated that the excision and of Trb-1 is integrase dependent. Furthermore, in this work it was shown for the first time that the *lvr* region and especially the putative phage repressor LvrR, is involved in the regulation of Trb-1 excision. Conjugation of Trb-1 in *L. oakridgensis* does not influence the *in vivo* fitness of the transconjugants in human macrophages.

The genomic islands LpcGI-1 and LpcGI-2 encode a new putative T4SS. For the first time it could be demonstrated, that the T4SS localized on LpcGI-2 is functional. Although LpcGI-2 could be mobilized and transferred via conjugation to another *L. pneumophila* strain, followed by the site-specific integration into the genome of the transconjugants. LpcGI-1 and LpcGI-2 are flanked by the tRNA^{Thr} or tRNA^{Met} gene respectively. Both islands can exist in different chromosomal and episomal forms. The excision of LpcGI-2 occurs similar to Trb-1 in an integrase dependent manner.

Two additional genomic islands (LpcGI-Asn and LpcGI-Phe) could be identified in the genome of *Lp* Corby. Moreover, data of the *in silico* analysis demonstrated, that genomic islands similar to Trb-1, LpcGI-2 and LpcGI-1 are distributed within the genus *Legionella*.

Keywords: *Legionella*, type IV secretion system, conjugation, genomic island, integrase

1 Einleitung

1.1 Der Genus *Legionella*

Im Juli 1976 kam es während eines Veteranentreffens der American Legion im Bellevue-Stanford Hotel in Philadelphia zu einer Epidemie mit einem bis dahin unbekannten Erreger. Bei 182 der über 4000 Delegierten wurde eine schwere Pneumonie diagnostiziert, an der letztendlich 29 Patienten verstarben (Fraser et al., 1977). Als Verursacher wurde ein Bakterium identifiziert, das aus dem Lungengewebe eines verstorbenen Patienten isoliert wurde und in Anlehnung an den großen Krankheitsausbruch als *Legionella pneumophila* klassifiziert wurde (McDade et al., 1977). Legionellen gehören zur Familie der *Legionellaceae* und werden der Gattung der Gammaproteobacteria zugeordnet (Benson und Fields, 1998). Die Gattung *Legionella* umfasst inzwischen mehr als 50 Arten und mindestens 73 Serogruppen, davon 15 Serogruppen allein bei *L. pneumophila* (Benson und Fields, 1998; Diederer, 2008; Yu et al., 2002). Zusätzlich zu den klassischen *Legionella* Stämmen sind zwölf LLAPs (*Legionella*-like amoebal pathogens) bekannt. Hierbei handelt es sich um *Legionella* Stämme, die aus Patientenisolaten oder Umweltproben isoliert wurden. Diese *Legionella* Stämme können in Standard *Legionella* Medien nicht wachsen und müssen in Co-Kultur mit Protozoen kultiviert werden (Adeleke et al., 2001; Adeleke et al., 1996; La Scola et al., 2004; Newsome et al., 1998).

1.2 Biologie und Vorkommen von *L. pneumophila*

Legionella pneumophila ist ein Gram-negatives, obligat aerobes, nicht sporenbildendes und unipolar flagelliertes Stäbchenbakterium, mit einer Länge von 2 bis 20 µm und einem Durchmesser von 0,5 bis 0,7 µm (Blackmon et al., 1981). Legionellen sind Umweltkeime, die in natürlichen Süßwasserhabitaten vorkommen (Fliermans et al., 1981), wo sie in geringer Zahl in Oberflächengewässern und Grundwasser gefunden werden. Die fakultativ-intrazellulären Bakterien vermehren sich in freilebenden Protozoen, wie z. B. *Acanthamoeba castellanii*, *Hartmanella vermiformis*, *Naegleria* spp. und *Dictyostelium discoideum* (Fields, 1996; Steinert und Heuner, 2005). Für die Replikation benötigen Legionellen Temperaturen

zwischen 25 und 45°C, wobei das Temperaturoptimum bei 35°C liegt (Katz und Hammel, 1987). Optimale Bedingungen für das Wachstum und die Verbreitung finden Legionellen daher vor allem in künstlichen Warmwassersystemen, wie z. B. in Hotels, Krankenhäusern, Schwimmbädern und Whirlpools (Flannery et al., 2006; Moore et al., 2006). Zusätzlich begünstigen Ablagerungen und die Bildung von Biofilmen die Vermehrung von Legionellen in von Menschen geschaffenen Wasserleitungssystemen (Rogers et al., 1994). Die Ansteckung erfolgt in der Regel durch die Inhalation von Legionellen-haltigen Aerosolen oder durch die Aspiration von kontaminiertem Wasser. Durch das Einatmen der kontaminierten Aerosole gelangen die Erreger in die menschliche Lunge, wo sie effizient in humanen Monozyten und alveolaren Makrophagen replizieren können (Horwitz und Silverstein, 1980). Eine direkte Übertragung von Mensch zu Mensch konnte bisher nicht nachgewiesen werden (Fields, 1996).

1.3 *Legionella* als Krankheitserreger

1.3.1 Legionellose

Die Legionellose, auch bekannt als Legionärskrankheit, ist eine schwere Form der Lungenentzündung, die durch Legionellen verursacht wird (Fraser et al., 1977). Nach einer Inkubationszeit von 2 bis 10 Tagen treten die ersten Symptome auf, wie Kopf- und Gliederschmerzen, Reizhusten, Schüttelfrost und ein relativ schneller Anstieg der Körpertemperatur auf über 40°C. In einigen Fällen kann es zu Durchfällen und Erbrechen, sowie Abdominalschmerzen kommen. Bei schweren Verläufen, mit Beteiligung des Zentralen Nervensystems, wurden Verwirrheitszustände und Delirium beobachtet (Fields et al., 2002; Tsai et al., 1979). Vor allem bei älteren Menschen und Personen mit geschwächtem Immunsystem kann die Legionellose zum Tode führen (Fraser et al., 1977). Ursachen für den tödlichen Verlauf sind vor allem eine Sepsis und respiratorische Insuffizienz (Edelstein, 2008). Neben einem schweren Krankheitsverlauf kann die Legionellose auch ohne Pneumonie, als sogenanntes Pontiac-Fieber auftreten. Bei dieser leichteren Form der Legionellose beträgt die Inkubationszeit im Durchschnitt 1 bis 2 Tage. Das Pontiac-Fieber äußert sich vor allem durch grippeähnliche Symptome und verläuft in der Regel ohne bleibende Schäden (Glick et al., 1978). Im Falle einer Serokonversion, kann die Infektion mit

Legionellen auch vollständig asymptomatisch verlaufen (Boshuizen et al., 2003; Boshuizen et al., 2001). In etwa 75 % der Fälle wird die Legionellose, durch eine Infektion mit *Legionella pneumophila* der Serogruppe 1 verursacht. Andere *L. pneumophila* Serogruppen sind hingegen für ca. 20 bis 30 % der Erkrankungen verantwortlich (Helbig et al., 2002; McNally et al., 2000; Yu et al., 2002). Bei 5 bis 10 % der *Legionella*-Infektionen handelt es sich beim Erreger, um einen „nicht-*pneumophila*“ Stamm, wie z. B. *L. bozemanii*, *L. micdadei* oder *L. longbeachae* (Muder und Yu, 2002).

1.3.2 Diagnostik und Therapie

Für die Legionärskrankheit besteht in der Bundesrepublik Deutschland seit Januar 2001 eine Meldepflicht. Alle klinisch-labordiagnostischen bzw. klinisch-epidemiologischen Fälle müssen an das Robert Koch-Institut übermittelt werden (§7 Infektionsschutzgesetz). Zur Diagnose einer Infektion mit Legionellen werden vor allem respiratorisches Material, wie z. B. Lungengewebe, Trachealsekret, bronchoalveoläre Lavage, Sputum oder Pleuralflüssigkeit, aber auch Blut- und Stuhlproben, herangezogen (Edelstein, 1987; Rowbotham, 1998). Die Erreger können in den Patientenproben mit Hilfe verschiedener Methoden nachgewiesen werden. Mit einer Sensitivität von ca. 60 % und einer Spezifität von nahezu 100 %, gilt der kulturelle Nachweis der Legionellen auf spezifischen BCYE (Buffered charcoal yeast extract) Agarplatten nach wie vor als klassische Standardmethode (Edelstein, 1987). Ein Nachteil des kulturellen Nachweises ist, dass das Ergebnis erst nach einigen Tagen vorliegt. Die Methode bietet jedoch den Vorteil, dass durch den Vergleich von Patientenisolaten und Umweltproben, mögliche Infektionsquellen identifiziert werden können. Eine deutlich schnellere und frühzeitigere Diagnose erlaubt der Urin-Antigentest mittels ELISA (Boshuizen et al., 2003). Mit dem Antigentest werden in erster Linie Infektionen mit *L. pneumophila* der Serogruppe 1 nachgewiesen. Ein Nachteil kommerzieller Test Kits ist daher vor allem ihre geringe Sensitivität gegenüber anderen *L. pneumophila* Serogruppen und *Legionella* Spezies. Eine weitere Möglichkeit ist die Diagnose der Erreger über direkte Immunfluoreszenz, mit der Methode des „direct fluorescent antibody testing“ (DFA) möglich (Hayden et al., 2001), sowie durch einen Antikörpernachweis mittels indirekter Fluoreszenztests, wie dem „indirect immunofluorescence assay“ (IFA) (Stout und Yu, 2003). Auch Amplifikationsmethoden, wie PCR und Real-time PCR, spielen eine immer größere Rolle bei der Detektion von *Legionella*-DNA (Den Boer und Yzerman, 2004).

Die Legionellose kann mit Antibiotika gut behandelt werden. Seit der Epidemie in Philadelphia im Jahre 1976, wird in erster Linie Erythromycin zur Therapie verwendet. Bei einer schweren *Legionella* Pneumonie kann zusätzlich Rifampicin verabreicht werden. Aufgrund ihrer schnelleren und bakteriziden Wirkung kommen vor allem bei immunsupprimierten Patienten neuere Makrolidantibiotika, wie z. B. Azithromycin und Clarithromycin, oder Fluorchinolone, wie z. B. Ciprofloxacin und Moxifloxacin, zum Einsatz (Edelstein et al., 2003; Hammerschlag et al., 2001; Nielsen et al., 2000; Stout et al., 1998; Stout et al., 2005). Beim Pontiac-Fieber ist in der Regel keine Therapie mit Antibiotika erforderlich, hier erfolgt meist nur eine Behandlung der Symptome.

1.4 *L. pneumophila*: ein intrazellulärer Erreger

1.4.1 Die Replikation in eukaryotischen Zellen

Der fakultativ-intrazelluläre Erreger *L. pneumophila* nutzt für die Replikation in Amöben und humanen Alveolarmakrophagen einen sehr ähnlichen Mechanismus (Gao et al., 1997). Die Bakterien werden durch Phagozytose in die Zelle aufgenommen und liegen dort in einer sogenannten „*Legionella*-containing vacuole“ (LCV) vor (Abb. 1) (Isberg et al., 2009). Während avirulente Bakterien durch den Mechanismus der Phagozytose enzymatisch verdaut werden, verhindert *L. pneumophila* die Ansäuerung und Reifung des Phagosoms, indem der Erreger die Verschmelzung der Vakuole mit den Lysosomen unterbindet (Horwitz und Maxfield, 1984). Bei diesem Prozess spielt vor allem das Dot/Icm (Defect organelle trafficking; Interacellular multiplication) System eine entscheidende Rolle (Hubber und Roy, 2010; Roy et al., 1998). Vor allem die sekretierten Dot/Icm Effektorproteine LegA8, AnkX oder AnkN scheinen daran beteiligt zu sein die Fusion der LCV mit den Lysosomen zu unterbinden (Habyarimana et al., 2008; Pan et al., 2008). Bereits wenige Minuten nach der Aufnahme der Bakterien fusioniert die Vakuole mit Mitochondrien und beginnt Vesikeln des Endoplasmatischen Retikulums (ER) zu rekrutieren (Abb. 1) (Swanson und Isberg, 1995). Die Oberfläche der LCV ist schließlich von den ER-Vesikeln umgeben und bekommt durch die Besetzung mit Ribosomen einen dem rauen ER ähnlichen Charakter (Abu Kwaik, 1996; Tilney et al., 2001). Nach Etablierung der nährstoffreichen Replikationsvakuole durchlaufen die Bakterien mehrere Replikationszyklen. Bedingt durch das zunehmende Defizit an

Nährstoffen differenziert sich *L. pneumophila* schließlich in die transmissive und virulente Form (Byrne und Swanson, 1998). Die Freisetzung der Legionellen erfolgt vermutlich durch eine Lyse der Zellen oder mit Hilfe von Membranvesikeln (Berk et al., 1998; Gao und Kwaik, 2000; Oldham und Rodgers, 1985). Dot/Icm Effektorproteine besitzen auch bei diesen Prozessen wichtige Funktionen. Sekretierte Effektoren, wie z. B. LidA, RalF oder SidM steuern u. a. die Rekrutierung von Wirtszellproteinen (Conover et al., 2003; Machner und Isberg, 2007; Nagai et al., 2002). Andere Effektorproteine, wie z. B. AnkB, AnkH oder AnkJ sind an der Formation der Replikationsvakuole oder sind wie z. B. LepA und LepB, an der Freisetzung von *L. pneumophila* aus der Wirtszelle beteiligt (Nora et al., 2009). Nach dem Verlassen der Wirtszelle kann *L. pneumophila* einen neuen Infektionszyklus starten.

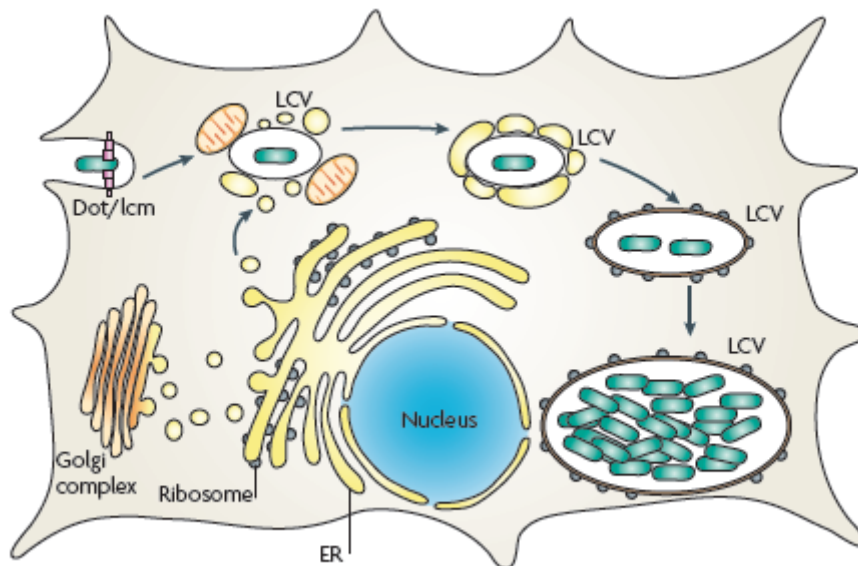


Abb. 1: Replikation von *L. pneumophila* in eukaryotischen Zellen. Nach der Phagozytose erfolgt die Bildung der „Legionella containing vacuole“ (LCV) und anschließend die Replikation der Erreger. (Isberg et al., 2009)

1.4.2 Der biphasische Lebenszyklus

Legionella pneumophila verfügt über einen biphasischen Lebenszyklus. Bei einem hohen Nährstoffangebot befinden sich die Bakterien in der replikativen Phase. In dieser nicht-virulenten Phase ist *L. pneumophila* salzresistent und nicht-flagelliert. Gehen die Nährstoffe zur Neige, treten die Bakterien in die transmissive Phase über. Die Legionellen werden

virulent, salzsensitiv und durch die Ausbildung der Flagelle hoch motil (Byrne und Swanson, 1998). Mikroarray Analysen zeigen, dass während der replikativen Phase vor allem Gene aktiv sind, die für die Verwertung der Nährstoffe benötigt werden. Hingegen ist in der transmissiven Phase überwiegend die Expression von Virulenzfaktoren hochreguliert, darunter viele Dot/Icm Substrate und Gene, die an der Flagellenbiosynthese beteiligt sind (Brüggemann et al., 2006). Der Übergang von der replikativen zur transmissiven Phase wird durch eine Vielzahl komplexer Regulationsmechanismen kontrolliert. Bedingt durch den Nährstoffmangel, führt ein Defizit an Aminosäuren zur Synthese des Alarmons Guanosin-3',5'-bispyrophosphat (ppGpp), durch die Synthasen RelA und SpoT (Dalebroux et al., 2009; Hammer und Swanson, 1999; Jain et al., 1996). Durch die Akkumulation von ppGpp kommt es zur Aktivierung des Zwei-Komponenten-Systems LetA/LetS (*Legionella* transmission activator and sensor) (Hammer et al., 2002). Der Response Regulator LetA/LetS induziert die Synthese der regulatorischen RNA Moleküle RsmY und RsmZ. Diese kleinen RNAs heben die inhibitorische Wirkung von CsrA (Carbon storage regulator) auf, indem sie die Bindung des Regulators an mRNA Moleküle verringern und dadurch die Expression der transmissiven Gene ermöglichen (Rasis und Segal, 2009; Sahr et al., 2009). Ein weiterer wichtiger Regulator ist der alternative Sigmafaktor RpoS, der vor allem während der stationären Phase verstärkt exprimiert wird. RpoS spielt nicht nur eine essentielle Rolle bei der Replikation in *A. castellanii*, sondern reguliert bei *L. pneumophila* auch die Flagellierung, die Salzsensitivität und die Ausbildung weiterer transmissiver Merkmale (Bachman und Swanson, 2001; Hales und Shuman, 1999). Charakteristisch für die transmissive Phase sind vor allem die Pigmentierung, die Ausbildung von Stressresistenzen und die Zytotoxizität (Fettes et al., 2001; Molofsky und Swanson, 2003). Zusätzlich zur replikativen und transmissiven Phase existiert bei *L. pneumophila* auch ein sogenanntes MIF-Stadium (matere interacellular form). Das MIF-Stadium der Stäbchenbakterien zeichnet sich durch eine verkürzte Form und einer Vielzahl an Poly- β -hydroxybutyrat Einschlüssen in der inneren und äußeren Membran aus (Garduno et al., 2002). In dieser Zysten ähnlichen Form sind die Erreger hochvirulent und resistenter gegenüber Antibiotika und anderen Umwelteinflüssen (Barker et al., 1995; Cirillo et al., 1999).

1.5 Virulenzfaktoren bei *L. pneumophila*

1.5.1 Sekretionssysteme

Der Export von Substraten aus der bakteriellen Zelle erfordert spezielle Transportsysteme. Pathogene Bakterien nutzen Sekretionssysteme, um Virulenzfaktoren, wie z. B. Toxine und andere Proteine, aber auch einzelsträngige DNA, an die Zelloberfläche, ins Medium oder direkt in die Wirtszelle zu transportieren. Vor allem für Gram-negative Bakterien stellt der Transport über zwei Membranen hinweg eine Herausforderung dar. Neben den Proteinsekretionssystemen Sec und Tat, die eine Translokation über die innere Membran vermitteln, sind bei Gram-negativen Bakterien die Sekretionssysteme Typ I bis V bekannt (Gerlach und Hensel, 2007).

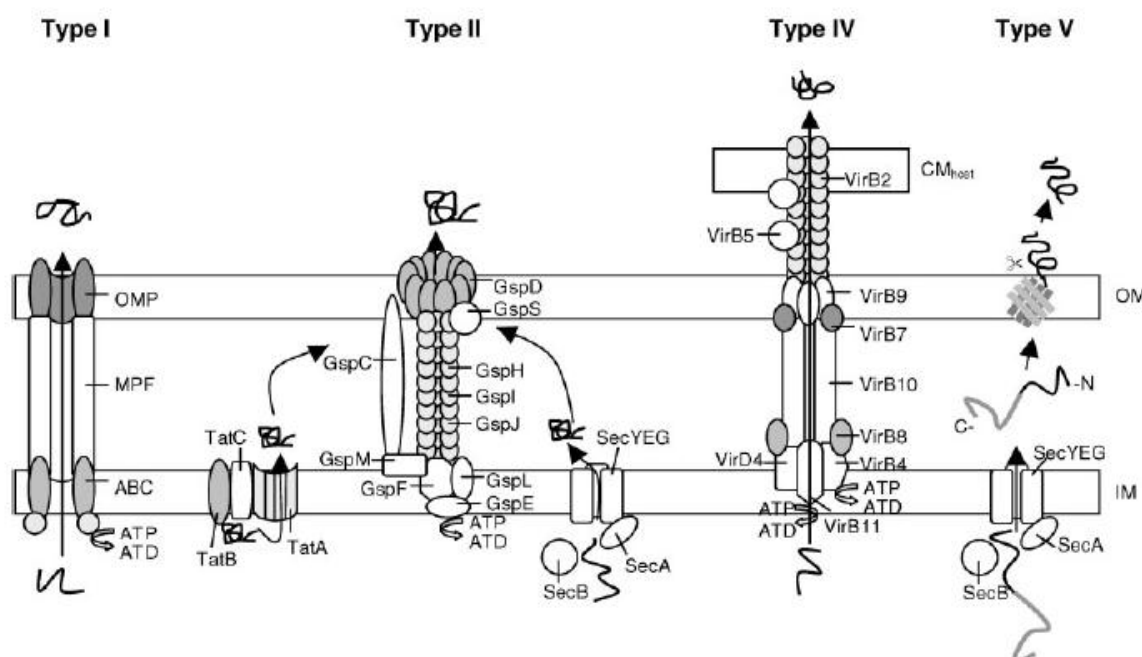


Abb. 2: Sekretionssysteme Gram-negativer Bakterien. Die Translokationssysteme Sec und Tat, sowie die Sekretionssysteme Typ I-V sind auch bei *L. pneumophila* präsent. (De Buck et al., 2007). IM (innere Membran), OM (äußere Membran), CM_{host} (Cytoplasmamembran der Wirtszelle)

1.5.1.1 Sec und Tat Translokation

Für die Translokation von Proteinen über die Cytoplasmamembran ins Periplasma nutzen Prokaryonten das generelle Sekretionssystem (Sec) und das „Twin-arginine translocation“ (Tat) System (Abb. 2). In Gram-negativen Bakterien werden die meisten extrazellulären Proteine in den periplasmatischen Raum über das Sec System transportiert. Proteine, die für die Sec Translokation bestimmt sind, besitzen eine N-terminale Signalsequenz. Der Sec-abhängige Proteintransport kann sowohl cotranslational, als auch posttranslational erfolgen und dient vor allem zur Translokation von ungefalteten Proteinen (de Keyser et al., 2003; Lee und Schneewind, 2001). Die Pore durch die innere Membran wird durch den trimeren Translokator SecYEG gebildet. Beim cotranslationalen Transport werden die Proteine mit Hilfe von YidC zur Translokationspore dirigiert. Für die posttranslationale Translokation sind neben der cytoplasmatischen ATPase SecA und dem Chaperon SecB, das die vorzeitige Proteinfaltung verhindert, auch die Proteine SecDF und YajC erforderlich (Lee und Schneewind, 2001; Robson und Collinson, 2006). Bis auf SecG codiert *L. pneumophila* für alle Proteine des Sec-Systems (De Buck et al., 2007). Im Gegensatz zum Sec-abhängigen Transport, erlaubt das Tat System die Translokation von bereits gefalteten Proteinen. Alle Proteine, die über das Tat System sekretiert werden, besitzen in ihrer N-terminalen Signalsequenz ein charakteristisches Motiv mit zwei nebeneinanderliegenden Argininresten (Berks et al., 2003). Im Genom der *L. pneumophila* Stämme Philadelphia und 130b sind die für den Transport essentiellen Proteine TatA, TatB und TatC codiert (De Buck et al., 2004; Rossier und Cianciotto, 2005). Das Tat Sekretionssystem ist bei *L. pneumophila* an der Formation von Biofilmen beteiligt und wird für die Replikation in Amöben und Makrophagen, sowie für das Wachstum bei niedrigen Eisen-Konzentrationen benötigt (De Buck et al., 2005; Rossier und Cianciotto, 2005). Zu den über das Tat System sekretierten Proteinen, gehören u. a. die Phospholipase C, die Cytochrom *c* Oxidase und LvrE (De Buck et al., 2007).

1.5.1.2 Das putative Typ I Sekretionssystem

Beim Typ I Sekretionssystem (T1SS) handelt es sich um einen ABC-Transporter. Dabei werden die Proteine in einem Schritt aus dem Cytosol, über die innere und äußere Membran, in den extrazellulären Raum transportiert (Abb. 2). Die Typ I Sekretion wird durch drei Proteine vermittelt, einem ABC-Transporter, einem Membranfusionsprotein und einem

äußeren Membranprotein. Der ABC (ATP-binding cassette) Transporter, eine in der inneren Membran verankerten ATPase, liefert durch die Hydrolyse von ATP, die für den Transport erforderliche Energie. Das Membranfusionsprotein durchspannt den periplasmatischen Raum und vermittelt den Transport des Substrates. Die Pore in der äußeren Membran wird durch das äußere Membranprotein gebildet (Gerlach und Hensel, 2007). Über das Typ I Transportsystem werden vor allem Toxine, Proteasen, degradierte Enzyme und andere Virulenzfaktoren in das extrazelluläre Milieu sekretiert, die eine carboxyterminale Signalsequenz besitzen (Binet et al., 1997; China und Goffaux, 1999). Bei *L. pneumophila* wurde ebenfalls ein putatives T1SS identifiziert. Das „*Legionella* secretion system“ (LSS) wird durch die Gene *lssXYZABD* codiert. Die Gene *lssB* und *lssD* weisen eine signifikante Übereinstimmung zu Genen des T1SS von *V. cholerae* bzw. *E. coli* auf. Das Gen *lssB* codiert für den ABC-Transporter und *lssD* für das Membranfusionsprotein. Mögliche Substrate der Typ I Proteinsekretion wurden bei *Legionella* bisher noch nicht identifiziert (Albert et al., 2006; Jacobi und Heuner, 2003).

1.5.1.3 Das Typ II Sekretionssystem

Das Typ II Sekretionssystem (T2SS) vermittelt bei Gram-negativen Bakterien den Transport von Substraten über die äußere Membran (Abb. 2). Die Sekretion über das Typ II System erfordert zunächst die Translokation der Proteine aus dem Cytosol, über die innere Membran, mit Hilfe des Sec oder Tat Systems. Der Prototyp eines T2SS ist das Pullulanase System von *Klebsiella* (Pugsley et al., 1997). Beim intrazellulären Erreger *Legionella pneumophila* wurde ebenfalls ein funktionelles T2SS identifiziert (Hales und Shuman, 1999). Das Translokationssystem besteht aus 12 Komponenten und wird vorwiegend durch die *lsp* („*Legionella* secretion pathway“) Gene *lspFGHIJK*, *lspDE*, *lspC*, *lspL* und *lspM* codiert. Bei *LspGHIJK* handelt es sich um die Pseudopiline und *lspF* codiert für ein Protein der inneren Membran. *LspD* bildet in der äußeren Membran die Sekretionspore, die ATPase *LspE* liefert die Energie für den Transport der Substrate und die Komponenten *LspC* und *LspM* begünstigen die Translokation des Substrates (Rossier et al., 2004). Neben den *Lsp* Proteinen stellt die Prepilin Peptidase *PilD* eine weitere essentielle Komponente des Transportsystems dar. *PilD* ist an der Biogenese der Typ IV Pili und am Zusammenbau des Typ II Sekretionsapparates beteiligt (Liles et al., 1999; Liles et al., 1998). Inzwischen wurden etwa 25 Proteine identifiziert, davon viele mit enzymatischer Aktivität, die mittels des T2SS aus der bakteriellen Zelle ausgeschleust werden (Cianciotto, 2009; Debroy et al., 2006; Pearce und Cianciotto, 2009). Dieses Proteinsekretionssystem spielt sowohl eine wichtige Rolle bei

der Kolonisierung und Bildung von Biofilmen, als auch für das Wachstum von *L. pneumophila* bei niedrigen Temperaturen (Lucas et al., 2006; Soderberg et al., 2004). Ebenso scheint das System auch an der Replikation der Legionellen in Makrophagen und Amöben beteiligt zu sein (Polesky et al., 2001; Rossier und Cianciotto, 2001).

1.5.1.4 Typ IV Sekretionssysteme

Typ IV Sekretionssysteme (T4SS) spielen eine wichtige Rolle bei der bakteriellen Pathogenität. Viele pathogene Bakterien, darunter *L. pneumophila*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Bordetella pertussis*, *Helicobacter pylori*, *Brucella* sp., *Rickettsia prowazekii* und *Coxiella burnetii*, nutzen zur Sekretion von Virulenzfaktoren ein T4SS (Sexton und Vogel, 2002). Diese Systeme dienen aber nicht nur der Proteinsekretion, sondern sie können auch als konjugative Systeme fungieren, die eine Übertragung von einzelsträngiger DNA in andere Zellen vermitteln (Ding et al., 2003). Ähnlich zum Typ I Sekretionssystem, erfolgt auch hier der Transport unabhängig vom Sec oder Tat System. Bei Gram-negativen Bakterien besteht das T4SS aus einem periplasmatischen Kanal, der die innere und äußere Membran verbindet und einer Pilus-ähnlichen Struktur, die den Kontakt zur Wirtszelle herstellt. Dadurch ermöglicht das Sekretionssystem den Transport von DNA und Proteinen aus dem bakteriellen Cytosol, über drei Membranen hinweg, in die Wirtszelle (Abb. 2). Die Typ IV Transportsysteme werden in zwei Kategorien unterteilt, in die Typ IVA (T4ASS) und die Typ IVB (T4BSS) Sekretionssysteme (Christie und Vogel, 2000). Als Prototyp des T4ASS fungiert das Vir System, das auf dem Ti-Plasmid von *A. tumefaciens* codiert ist. Daher werden alle Sekretionssysteme, die eine Ähnlichkeit zum Vir System besitzen, der Gruppe der T4ASS zugeordnet. Alle Typ IVB Sekretionssysteme sind hingegen zu den Tra/Trb Systemen der IncI Plasmide homolog (Christie und Vogel, 2000). Beim Dot/Icm System von *L. pneumophila* handelt es sich ebenfalls um ein T4BSS. Bei *L. pneumophila* besitzt das Dot/Icm System eine wichtige Funktion bei vielen intrazellulären Prozessen. Während einer Infektion werden über das Dot/Icm System eine Vielzahl an Effektorproteinen in die Wirtszellen transportiert (Ensminger und Isberg, 2009). Das Dot/Icm System ist daher essentiell für die intrazelluläre Replikation in Amöben und Makrophagen und der Bildung der LCV (Andrews et al., 1998; Segal und Shuman, 1997). Zudem ist das System in Mechanismen involviert, die zur Aufnahme der Legionellen führen, die Freisetzung aus den Wirtszellen vermitteln und die Apoptose der Wirtszellen inhibieren (Abu-Zant et al., 2007; Alli et al., 2000; Kirby et al., 1998; Molmeret et al., 2004). Die *dot/icm* Gene, die für den makromolekularen Komplex des

Sekretionssystems codieren, sind bei *L. pneumophila* in zwei genomischen Regionen organisiert (Abb. 3). Die Region I umfasst die Gene *icmVWX*, *dotA* und *dotBCD* und die Region II codiert für weitere 18 Gene, die zum Teil sowohl über eine *icm*, als auch *dot* Nomenklatur verfügen (Segal et al., 1998; Segal und Shuman, 1997; Vogel et al., 1998).

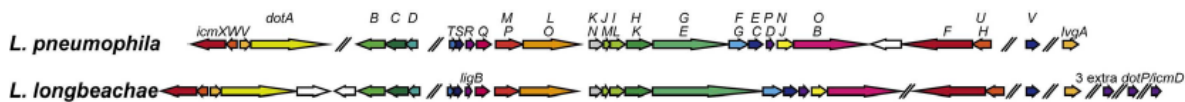


Abb. 3: Genomische Organisation des Dot/Icm Sekretionssystems bei *L. pneumophila* und *L. longbeachae*. (Nagai und Kubori, 2011)

Zusätzlich zum Dot/Icm bzw. T4BSS wurden in den bisher sequenzierten *Legionella* Stämmen weitere Sekretionssysteme identifiziert, die den T4ASS zugeordnet werden. Bei einem der Typ IVA Sekretionssysteme handelt es sich um das Lvh (*Legionella vir* homologue) System (Abb. 4). Das Lvh System wird durch die 11 Gene *lvhB2*, *B3*, *B4*, *B5*, *B7*, *B6*, *B8*, *B9*, *B10*, *B11* und *lvhD4* codiert, die zu den Genen des Vir Systems von *A. tumefaciens* homolog sind (Segal et al., 1999). Die *lvh* Gene sind im bakteriellen Chromosom auf einem Plasmid-ähnlichen Element organisiert, das in Abhängigkeit von der Wachstumsphase, innerhalb des Genoms integriert ist oder als extrachromosomales Plasmid vorliegt (Cazalet et al., 2004; Doleans-Jordheim et al., 2006). Im Vergleich zum Dot/Icm System, spielt das Lvh System für das intrazelluläre Wachstum in Amöben und Makrophagen keine essentielle Rolle (Segal et al., 1999). Es ist aber möglicherweise an der Replikation der Legionellen in Wirtszellen bei niedrigeren Temperaturen beteiligt und kann unter spezifischen Umweltbedingungen einige Funktionen des Dot/Icm Systems komplementieren (Bandyopadhyay et al., 2007; Ridenour et al., 2003). Die Gene des Lvh Systems wurden bisher in den sequenzierten *L. pneumophila* Stämmen Philadelphia, Paris, Lens und 130b identifiziert (Cazalet et al., 2004; Chien et al., 2004; Schroeder et al., 2010). Mögliche Proteine oder Substrate, die über das Lvh System sekretiert werden, sind bisher nicht bekannt.

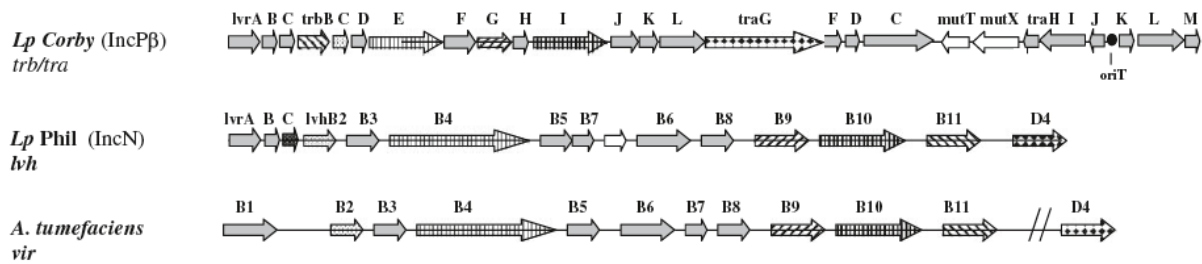


Abb. 4: Genomische Organisation der Typ IVA Sekretionssysteme bei *L. pneumophila* Corby (Trb/Tra System), *L. pneumophila* Philadelphia (LvH System) und *A. tumefaciens* (Vir System). (Glöckner et al., 2008)

Beim Trb/Tra Konjugationssystem von *L. pneumophila* Corby handelt es sich ebenfalls um ein Typ IVA Sekretionssystem (Abb. 4). Das konjugative System umfasst 11 *trb* (*trbB*, *C*, *D*, *E*, *F*, *G*, *H*, *I*, *J*, *K*, *L*) und 10 *tra* (*traG*, *F*, *D*, *C*, *H*, *I*, *J*, *K*, *L*, *M*) Gene. Im Genom von *L. pneumophila* Corby ist das Trb/Tra System auf den mobilen Elementen Trb-1 und Trb-2 lokalisiert (Glöckner et al., 2008). Die *trb/tra* Gene beider Elemente sind zum *tra/trb* Genlokus des IncP β Plasmids R751 von *Enterobacter aerogenes* homolog und weisen ebenfalls eine Ähnlichkeit zu einigen Genen des Vir Systems von *A. tumefaciens* auf. Ein Vergleich der *trb/tra* Gene von Trb-1 und Trb-2 zeigte eine Übereinstimmung von ca. 77 %. Bei Trb-1 und Trb-2 handelt es sich um genomische Inseln, die innerhalb der tRNA^{Pro} bzw. der tmRNA integriert sind. Beide Elemente können in der bakteriellen Zelle, sowohl in einer integrierten chromosomalen, als auch in einer zirkulären episomalen Form vorliegen (Glöckner et al., 2008). Zudem ist das auf Trb-1 codierte Trb/Tra Konjugationssystem funktionell. Trb-1 kann in andere *Legionella* Stämme konjugiert und anschließend ortsspezifisch in das Genom der Transkonjuganten integriert werden (Glöckner et al., 2008). Ähnliche Trb/Tra Systeme wurden u. a. auch in den Genomen der *L. pneumophila* Stämme Alcoy und 130b, sowie bei *L. longbeachae* identifiziert (Cazalet et al., 2010; D'Auria et al., 2010; Schroeder et al., 2010).

1.5.1.5 Das putative Typ V Sekretionssystem

Das Typ V Sekretionssystem (T5SS) ist ein Autotransporter System. Das Protein katalysiert selbständig seine Translokation über die äußere Membran. Die Typ V Sekretion ist Sec-abhängig und verläuft in zwei Schritten (Abb. 2). Zunächst wird das Autotransporterprotein mit Hilfe des generellen Sekretionssystems über die Cytoplasmamembran in das Periplasma transportiert. Im zweiten Schritt erfolgt die autokatalytische Translokation über die äußere Membran. Hierbei bildet die C-terminale Domäne des Autotransporters eine β -Barrel Pore in der äußeren Membran, durch die der aktive Anteil des Proteins hindurchgeschleust wird (Typ VA und C). Beim Typ VB Autotransporter wird die Pore durch ein zweites Protein gebildet (Desvaux et al., 2004; Henderson et al., 2004). Im Genom von *L. pneumophila* Paris wurde ein Gen identifiziert, das für einen putativen Autotransporter codiert. Das Genprodukt von *lpp0779* besitzt eine N-terminale Signalsequenz, die eine Sec-abhängige Translokation vermittelt und eine porenformende C-terminale Domäne (Cazalet et al., 2004).

1.5.2 Oberflächenproteine und -strukturen

1.5.2.1 Die Peptidylpropyl *cis-trans* Isomerase Mip

Beim „Macrophage infectivity potantiator“ (Mip) handelt es sich um ein Protein von ca. 24 kDa mit einer Peptidylpropyl *cis-trans* Isomerase (Pipas) Aktivität (Fischer et al., 1992). Mip ist ein wichtiger Virulenzfaktoren, der in seiner Aminosäuresequenz eine Ähnlichkeit zur Familie der eukaryotischen FK506 Bindeproteine aufweist, die zur Klasse der Immunophiline gehören (Hacker und Fischer, 1993). Das Protein liegt an der Zelloberfläche als Homodimer vor (Cianciotto et al., 1989; Schmidt et al., 1994). Mit Hilfe der PPIase Aktivität von Mip können Legionellen die Lungenepithelzellbarriere durchdringen und sich in der Lunge und den peripheren Organen ausbreiten (Wagner et al., 2007). In der Diagnostik dient die Nukleotidsequenz des *mip* Gens zur molekularen Typisierung von *Legionella* (Engleberg et al., 1989; Lindsay et al., 1994; Ratcliff et al., 1998).

1.5.2.2 Lipopolysaccharide

Lipopolysaccharide (LPS) bilden den Hauptbestandteil der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien. Die LPS Moleküle bestehen aus einem hydrophoben Lipidanteil, dem Lipid A und einer hydrophilen Polysaccharidkette, die aus dem Kernpolysaccharid und dem O-spezifischen Polysaccharid gebildet wird. Das LPS ist über das Lipid A in der äußeren Membran verankert und über das Kernpolysaccharid mit dem O-spezifischen Polysaccharid verbunden. Die O-spezifischen Polysaccharide wirken als Antigene. Diese O-Antigene fungieren zudem als wichtiges Kriterium zur serologischen Charakterisierung und Identifizierung von *L. pneumophila* und anderen *Legionella* Stämmen (Helbig et al., 2002; Yu et al., 2002).

1.5.2.3 Flagelle und Pili

Legionella pneumophila ist monopolar flagelliert (Chandler et al., 1980). Die Flagelle besteht aus einem Motorkomplex, der in der inneren und äußeren Membran verankert ist, einem Hacken und einem 20 nm langem Filament. Der Export der Komponenten über den Flagellen-Apparat dient als Beispiel der Typ III Sekretion (Aizawa, 2001; Macnab, 1999). Die Expression der Flagelle ist ein charakteristisches Merkmal der virulenten und transmissiven Phase von *L. pneumophila* (Molofsky und Swanson, 2004). Das Flagellen-Regulon ist eine Kaskade über die die Flagellensynthese reguliert wird. Faktoren dieser Kaskade sind zudem eng mit zellulären Mechanismen verbunden, die bei *Legionella* den Übergang von der replikativen in die transmissive Phase steuern (Albert-Weissenberger et al., 2010). Die Flagelle ermöglicht nicht nur die Motilität der Bakterien, sondern sie spielt auch eine wichtige Rolle bei der Adhäsion und Invasion von Wirtszellen und ist an der Induktion der Apoptose beteiligt (Dietrich et al., 2001; Molofsky et al., 2005). Zusätzlich zur Flagelle, exprimieren Legionellen als weitere Oberflächenstruktur die sogenannten Pili (Rodgers et al., 1980). Bei den Pili werden lange (0,8 bis 1,5 µm) und kurze (0,1 bis 0,6 µm) Formen unterschieden. Die Typ IV Pili spielen u. a. eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion, sowie der natürlichen Kompetenz von *L. pneumophila* (Stone und Abu Kwaik, 1998; Stone und Kwaik, 1999).

1.6 *Legionella* „Genomics“

L. pneumophila Philadelphia war der erste *Legionella* Stamm der Serogruppe 1 (Sg1), dessen Genom vollständig sequenziert wurde (Chien et al., 2004). Seitdem wurde die Sequenzierung und Analyse einer Reihe weiterer *L. pneumophila* und „non-*pneumophila*“ Stämme abgeschlossen bzw. in Angriff genommen. Die Genome der bisher sequenzierten *L. pneumophila* Stämme sind zwischen 3,3 bis 3,5 Mb groß, mit einem G+C Gehalt von ca. 38 % und einer Gesamtanzahl von ca. 3000 bis 3300 Genen (Tab. 1). Im Allgemeinen ist die genomische Organisation des Chromosoms bei den bisher sequenzierten *L. pneumophila* Stämmen weitgehend konserviert (Amaro et al., 2012; Cazalet et al., 2004; D'Auria et al., 2010; Glöckner et al., 2008; Schroeder et al., 2010). Bei einem Vergleich von sechs *L. pneumophila* Genomen wurde vor kurzem festgestellt, dass insgesamt 2434 Gene der Stämme Philadelphia, Paris, Lens, Corby, Lorraine und HL06041035 ortholog sind (Gomez-Valero et al., 2011). Interessanterweise zeigte sich, dass der Erreger *L. longbeachae*, der vor allem in Australien für ca. 30 % der Legionellosen verantwortlich ist, im Vergleich zu *L. pneumophila*, ein um ca. 500 kb größeres Genom mit einem G+C Gehalt von ca. 37 % besitzt (Cazalet et al., 2010; Yu et al., 2002). Des Weiteren wurden Unterschiede in der Organisation des Genoms und des Genpools festgestellt. Nur 65,2 % der *L. longbeachae* Gene sind zu Genen von *L. pneumophila* ortholog (Cazalet et al., 2010). Einige *L. pneumophila* Stämme, wie Paris und Lens, sowie *L. longbeachae* NSW 150, verfügen zusätzlich noch über ein Plasmid, das u. a. für eine *tra*-Region codiert (Cazalet et al., 2010; Cazalet et al., 2004). Auch der Stamm *L. dumoffii* TEX-KL, dessen Chromosom kürzlich teilweise sequenziert wurde, besitzt zwei Plasmide, von denen eines zum Plasmid pLPP von *L. pneumophila* Paris homolog ist (Qin et al., 2012). *L. pneumophila* codiert zudem für eine Anzahl verschiedener Sekretionssysteme. Neben dem Tat System, dem T1SS und T2SS, sind auch das T4BSS bzw. das Dot/Icm System, sowie verschiedene T4ASS präsent (Cazalet et al., 2008). Im Genom von *L. longbeachae* wurden drei putative T1SS identifiziert, von denen zwei funktionell sind (Cazalet et al., 2010). Die Komponenten und die genomische Organisation der codierenden Regionen des Dot/Icm Systems sind innerhalb des Genus *Legionella* konserviert (Cazalet et al., 2008; Gomez-Valero et al., 2011). Bis auf wenige Ausnahmen, ist auch der Großteil der bisher bekannten Dot/Icm Substrate bei allen *L. pneumophila* Stämmen identisch (Amaro et al., 2012; Gomez-Valero et al., 2011; Schroeder et al., 2010). Anders verhält es sich bei *L. longbeachae*, denn ca. 66 %, der für *L. pneumophila* beschriebenen Dot/Icm Substrate sind bei diesem Stamm nicht präsent. Stattdessen wurden hier 51 neue putative Effektorproteine

identifiziert (Cazalet et al., 2010). Unterschiede zwischen den Stämmen zeigen sich auch in der Anzahl und Art der T4ASS. Die *lvh* Region ist bei *L. pneumophila* Philadelphia, Paris, Lens, sowie dem Stamm 130b, der über zwei Lvh-Systeme (LvH-1 und LvH-2) verfügt, codiert (Cazalet et al., 2004; Chien et al., 2004; Schroeder et al., 2010). Ein neues Konjugations-/Typ IVA Sekretionssystem wurde als erstes für *L. pneumophila* Corby beschrieben. Das Trb/Tra System ist jeweils auf den genomischen Inseln Trb-1 und Trb-2 lokalisiert (Glöckner et al., 2008). Der Stamm Alcoy, dessen Genom im Vergleich zu anderen *L. pneumophila* Stämmen, vor allem mit demjenigen von Corby die höchste Übereinstimmung aufweist, codiert ebenfalls für das Trb/Tra System. Die genomischen Inseln DT1 und DT2 von *L. pneumophila* Alcoy sind zu Trb-2 bzw. Trb-1 ähnlich (D'Auria et al., 2010). Ähnliche Systeme wurden auch für *L. pneumophila* 130b und *L. longbeachae* NSW 150 beschrieben (Cazalet et al., 2010; Schroeder et al., 2010). Zusätzlich wurde bei *L. pneumophila* Philadelphia und *L. longbeachae* NSW 150 eine *tra* Region detektiert, die eine Ähnlichkeit zu den *tra/trb* Genen des F-Plasmids von *E. coli* aufweist (Cazalet et al., 2010; Chien et al., 2004; Gomez-Valero et al., 2011). Ein weiterer interessanter Fund sind sogenannte „Efflux Inseln“, auf denen neben einer ATP Synthase, Gene für chemiosmotische Systeme (*cebABC*, *cecABC*), verschiedene Effluxtransporter (*helABC*, *cadA*, *copA1*, *copA2*, *ctpA*) und andere toxische Substanzen lokalisiert sind (Cazalet et al., 2004; Chien et al., 2004). Diese genomischen Elemente sind mit einer Region assoziiert, die für neues putatives T4SS codiert und eine Ähnlichkeit zum GI-T4SS des konjugativen Elements ICEhin1056 von *Haemophilus influenzae* aufweist (Juhas et al., 2007; Schroeder et al., 2010). Das neue putative T4SS von *L. pneumophila* codiert für homologe T4SS Komponenten und der charakteristischen *lvr* Region (*Legionella* *vir* region), die auch mit anderen genomischen Elementen bei *Legionella* verbunden ist (Cazalet et al., 2004; Schroeder et al., 2010). Ein weiterer interessanter Aspekt der Genomanalysen war die Identifizierung von Genen, deren Genprodukte zu eukaryotischen Proteinen ähnlich sind und/oder Domänen eukaryotischen Ursprungs enthalten (Cazalet et al., 2004; Gomez-Valero et al., 2009). Unter den „eukaryotischen“ Proteinen wurden u. a. F-Box Proteine, eine putative Serin/Threonin Proteinkinasen, eine Glucoamylase, eine Sphingosin-1-phosphat-Lyase und eine Apyrase identifiziert und einige der Proteine scheinen auch bei der Interaktion von Pathogenen mit ihren Wirtszellen von Bedeutung zu sein (Cazalet et al., 2008; Lomma et al., 2009). Analysen und Vergleiche der Genome verschiedener *Legionella* Stämme lassen erkennen, dass die Genome sowohl hoch konservierte, als auch relativ variable Regionen enthalten (D'Auria et al., 2010; Gomez-Valero et al., 2011). Die Variabilität der *Legionella* Genome lässt auf einen Austausch von genetischen Material zwischen den

Pathogenen und ihren Wirtszellen, sowie zwischen verschiedenen *Legionella* Stämmen schließen (Gomez-Valero et al., 2011).

Tab. 1: Übersicht über die bisher vollständig sequenzierten *Legionella* Genome. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>)

Stämme	<i>L. pneumophila</i>						<i>L. longbeachae</i>	
	Philadelphia	Paris	Lens	Corby	Alcoy	130b	570-CO-H	NSW 150
Chromosom (Mb)	3.4	3.5	3.35	3.58	3.52	3.49	3.36	4.08
G+C Gehalt (%)	38,3	38,4	38,4	38,5	38,4	38,2	38,2	37,1
Gene	3.003	3.136	3.001	3.257	3.243	3.330	2.981	3.664
Proteine	2.943	3.027	2.878	3.204	3.190	3.141	2.926	3.403
tRNAs	43	43	43	44	43	42	43	46
Plasmide	0	1	1	0	0	0	0	1

1.7 Merkmale und Bedeutung genomischer Elemente

Bakterielle Genome bestehen aus einem Kerngenpool, zu dem das Chromosom und bei einigen Spezies zusätzlich auch Plasmide angehören und einem flexiblen Genpool, der verschiedene mobile genomische Elemente umfasst (Hacker und Carniel, 2001). Während der Kerngenpool relativ konstant ist, variiert der flexible Genpool nicht nur bei verschiedenen Spezies, sondern kann auch innerhalb des Genus unterschiedlich sein. Zu den mobilen genomischen Elementen zählen Plasmide, Bakteriophagen, Islets (<10 kb), Integrone, IS-Elemente, Transposons, ICEs (integrative conjugative elements) und konjugative Transposons (Boyd et al., 2009; Dobrindt et al., 2004; Hacker und Carniel, 2001). Im Allgemeinen werden genomische Elemente auch unter dem Begriff der genomischen Inseln (GI) geführt, die sich anhand gemeinsamer Merkmale (Abb. 5) charakterisieren lassen (Hacker und Carniel, 2001; Juhas et al., 2009). Genomische Inseln sind in der Regel zwischen 10 und 200 kb groß und zeichnen sich im Vergleich zum bakteriellen Chromosom durch einen unterschiedlichen G+C Gehalt und Codongebrauch aus. Im bakteriellen Genom liegen GIs oft in Assoziation mit tRNA Genen vor und werden nach der Integration von spezifischen Rekombinationsstellen, sogenannten „direct repeats“ (DR) oder auch „attachment sites“ (*att*) flankiert (Hacker et al., 1997). Die Nukleotidsequenzen der Rekombinationsstellen stimmen in der Regel mit den 3'-Enden der tRNA Gene überein und dienen als spezifische Erkennungssequenzen für Rekombinasen bzw. Integrasen (Williams, 2002). Diese Enzyme katalysieren die ortsspezifische Integration und Exzision der GIs aus dem bakteriellen Genom (Grindley et al.,

2006). Neben der Integrase, codieren genomische Inseln oft für weitere Faktoren bzw. konjugative Systeme, die ihren Transfer vermitteln. Ebenso können auf den GIs IS-Elemente oder Transposons lokalisiert sein (Buchrieser et al., 1998; Glöckner et al., 2008; Hacker und Carniel, 2001). Zusätzlich zu den Mobilitätsgenen codieren genomische Inseln oft für verschiedene biologische Funktionen, die in erster Linie für das Wachstum der Bakterien nicht essentiell sind, aber unter veränderten Umweltbedingungen die mikrobielle Fitness erhöhen können. In Abhängigkeit dieser zusätzlicher Funktionen lassen sich genomische Inseln in Pathogenitäts-, Metabolismus-, Fitness-, Resistenz- oder symbiotischen Inseln klassifizieren (Dobrindt et al., 2004). Pathogenitätsinseln (PAIs) sind eng mit der bakteriellen Pathogenität assoziiert und wurden erstmals bei uropathogenen *E. coli* (UPEC) Bakterien identifiziert (Hacker et al., 1990; Hacker et al., 1997). Die genomische Insel HPI (high pathogenicity island) von *Yersinia* spp. kann sowohl als Pathogenitäts-, als auch als Fitnessinsel angesehen werden (Dobrindt et al., 2004). HPI codiert für das Yersiniabactin Siderophorsystem, das die Bindung und den Transport von Eisen(III)-Ionen in die Zelle ermöglicht (Carniel et al., 1996). Genomische Inseln, die für Resistenzgene codieren, vermitteln ihren Besitzern unter bestimmten Umweltbedingungen ebenfalls Vorteile. Zu den bekannten Resistenzinseln gehört das SXT Element von *Vibrio cholerae* oder die genomische Insel SCCmec von *Staphylococcus aureus*, die für Antibiotikaresistenzen codieren (Beaber et al., 2002; Hiramatsu et al., 2002).

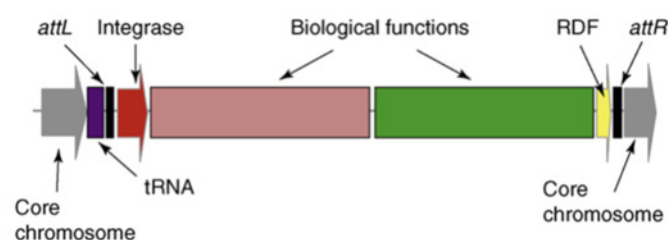


Abb. 5: Schematische Darstellung der Hauptkomponenten einer genomischen Insel (GI). Die Integration einer genomischen Insel in das bakterielle Chromosom (graue Pfeile) erfolgt meist innerhalb eines tRNA Gens (lila Box). Im integrierten Zustand ist die genomische Insel von spezifischen Rekombinationsstellen bzw. „attachment sites“, *attL* und *attR* (schwarze Boxen) flankiert. Neben einer ortsspezifischen Integrase (roter Pfeil) und einem Rekombinationsfaktor RDF (recombination directionality factor) oder Exzisionase (gelber Pfeil), können GIs zusätzlich für Gene verschiedener biologischer Funktionen (rosa und grüne Box) codieren. (Boyd et al., 2009)

1.8 Die Mechanismen des horizontalen Gentransfers

Bakterien vermehren sich vegetativ. Spontane und ungerichtete Mutationen, sowie der Austausch von genetischem Material über horizontalen Gentransfer, stellen daher für die Evolution und die Veränderung bakterieller Genome wichtige Mechanismen dar (Dobrindt et al., 2004). Bei den drei generellen Mechanismen des horizontalen Gentransfers handelt es sich um die Transformation, die Transduktion und die Konjugation.

Die Transformation beschreibt die Aufnahme freier DNA aus dem Lebensraum und wurde sowohl bei Gram-positiven, als auch bei Gram-negativen Pathogenen und Umweltbakterien beobachtet. Bakterien, wie z. B. *Bacillus subtilis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas stutzeri* und auch *L. pneumophila*, sind natürlich kompetent und können DNA über einen aktiven Transport aus ihrer Umwelt in die bakterielle Zelle aufnehmen (Hamoen et al., 2001; Lorenz und Wackernagel, 1994; Meier und Wackernagel, 2005; Smith et al., 1995; Stone und Kwaik, 1999).

Die Transduktion beschreibt den Transfer von Genen, der zwischen Mikroorganismen mittels Bakteriophagen vermittelt wird (Davison, 1999). Zusätzlich zu den eigenen spezifischen viralen Genen können Bakteriophagen in ihrem Genom auch bakterielle Gene und genomische Inseln transportieren (Maiques et al., 2007).

Neben der Transformation und Transduktion, spielt vor allem die Konjugation beim Austausch von genetischen Elementen eine wichtige Rolle. Bei der Konjugation erfolgt eine direkte Übertragung der DNA-Moleküle von einer Donor- in eine Empfängerzelle. Der Transfer der DNA Substrate wird über spezielle Konjugationsapparate, die der Familie der Typ IV Sekretionssystemen angehören, vermittelt (Chen et al., 2005; Christie et al., 2005). Die Konjugation kann sowohl zwischen Bakterien der gleichen Spezies, als auch zwischen Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien erfolgen (Trieu-Cuot et al., 1988). Als Empfängerzellen für die bakterielle DNA können nicht nur Prokaryoten fungieren, sondern auch Pflanzenzellen, Pilze oder Säugetierzellen (Heinemann und Sprague, 1989; Waters, 2001). Das bekannteste T4SS ist das Vir System von *A. tumefaciens*. Das auf dem Ti-Plasmid codierte System dient vorwiegend zur Konjugation der T-DNA (Christie, 1997). Nach der Injektion in die pflanzliche Zelle kann die T-DNA in das Genom der Pflanze integriert werden und die Expression der tumorspezifischen Gene führt zur Entstehung von krebsartigen Wucherungen an der Pflanzenwurzel, den sogenannten Wurzelhalsgallen (Zambryski et al., 1980).

1.9 Rekombinasen

Die ortsspezifischen Rekombinasen katalysieren die drei wichtigen Mechanismen der Rekombination, die Integration, die Exzision und die Inversion spezifischer DNA-Segmente. Diese Enzyme werden in Abhängigkeit von der Homologie der Aminosäuresequenzen und vom katalytischen Rest in zwei große Gruppen klassifiziert, in die Familie der Tyrosin Rekombinasen und in die Familie der Serin Rekombinasen (Esposito und Scocca, 1997; Nunes-Duby et al., 1998; Smith und Thorpe, 2002).

1.9.1 Tyrosin Rekombinasen

Die Familie der Tyrosin Rekombinasen wird nach ihrem bekanntesten Mitglied, der Lambda (λ) Integrase, auch als sogenannte Integrase Familie bezeichnet. Die Proteinfamilie umfasst mehr als 1000 Rekombinasen, die vor allem bei Bakterien und Archaea, aber auch bei einigen Eukaryoten vertreten sind (Grindley et al., 2006). Neben der Integrase (Int) des λ Phagen werden u. a. die Cre Rekombinase des P1 Phagen, die Flp Invertase der Hefe und die prokaryotische Xer Rekombinase dieser Familie zugeordnet (Groth und Calos, 2004). Tyrosin-Rekombinasen besitzen im aktiven Zentrum einen Tyrosinrest, der während der Rekombination das DNA Rückgrat angreift. Zunächst kommt es zur Ausbildung der Rekombinationssynapse, bestehend aus zwei DNA Molekülen an die jeweils zwei Enzymmonomere gebunden sind. Während der Rekombination sind bei der Tyrosin Rekombinase immer nur zwei der vier Enzymmonomere aktiv, wodurch in jeder Doppelhelix jeweils nur ein Strang geschnitten wird. Die Reaktion beginnt mit dem nucleophilen Angriff des Tyrosinrestes auf das Phosphat (Abb. 6). In jedem DNA-Molekül wird ein Strang gespalten, wodurch jeweils ein kovalentes Intermediat aus Tyrosin und der 3'-Phosphatgruppe entsteht (Grindley et al., 2006). Die dabei freigewordenen 5'-Hydroxylgruppen greifen die 3'-Phosphotyrosineinheit des gegenüberliegenden DNA-Stranges an und es kommt zur Ausbildung der charakteristischen Holliday-Struktur (Abb. 6). Durch die Isomerisierung des gesamten Komplexes werden die DNA-Moleküle neu orientiert. Die bisher inaktiven Enzymmonomere werden aktiv und die bisher aktiven Monomere werden wieder inaktiv. Durch eine Wiederholung der bisherigen Reaktionsschritte kommt es zur Spaltung der beiden anderen DNA-Stränge, die zur Auflösung der Holliday-Struktur und zur Ausbildung der neuen Phosphodiesterbindungen führt. Am Ende der Reaktion und nach dem Auflösen des

Rekombinationskomplexes liegen zwei neue rekombinante DNA Doppelstränge vor (Grindley et al., 2006; Sadowski, 1986; Stark et al., 1992).

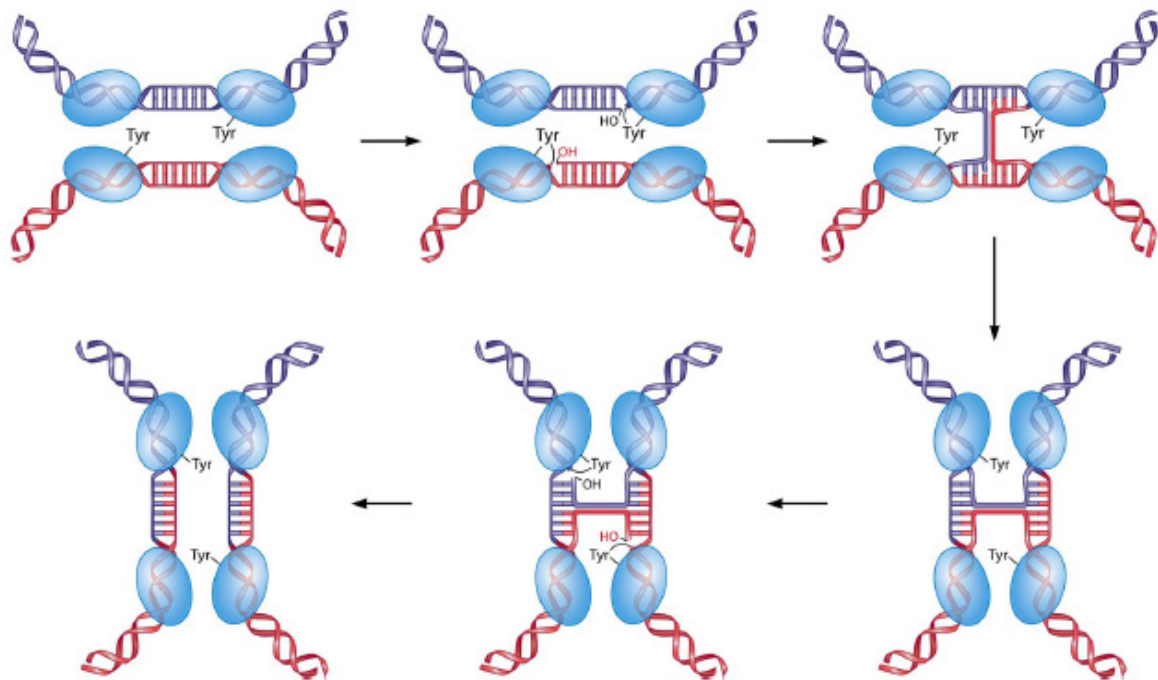


Abb. 6: Mechanismus der Rekombination bei Tyrosin Rekombinasen. Die beiden DNA Moleküle werden von vier Enzymmonomeren (blaue Ovale) der Tyrosin Rekombinase gebunden. Es sind jeweils immer nur zwei der vier Monomere aktiv (gekennzeichnet durch den Tyr-Rest). Zunächst spalten die zwei aktiven Monomere jeweils einen der DNA Doppelstränge, wodurch ein 3'-Phosphotyrosyl Intermediat und eine freie 5'-OH Gruppe entsteht. Der anschließende Austausch der DNA-Stränge führt zur Bildung der Holliday-Struktur. Es kommt zur Isomerisierung des Protein-DNA-Komplexes und zur Aktivierung der inaktiven Monomere, die eine Spaltung der zwei anderen DNA-Einzelstränge katalysieren. Der erneute Strangaustausch und die Ligation führen zur Bildung der rekombinanten DNA-Produkte. (Rajeev et al., 2009)

Tyrosin Rekombinasen benötigen für die Bindung an ihre DNA Substrate spezifische Erkennungsmotive. Der λ Phage kann nach der Infektion von *E. coli*, entweder den lytischen Lebenszyklus, was die Zerstörung des Wirtes zur Folge hat oder den lysogenen Zyklus einschlagen und als Prophage in das Genom seines Wirtes integrieren. Unter bestimmten Umweltbedingungen kann der Prophage wieder aus dem bakteriellen Chromosom ausgeschnitten werden und in den lytischen Zustand übergehen. Sowohl der Prozess der Integration, als auch die Exzision werden durch die λ Integrase katalysiert (Enquist et al., 1979). Für das Erkennen und Binden an spezifische DNA-Motive verfügt die Integrase über drei funktionelle Domänen, einer N-terminale „arm-type“ DNA Bindedomäne, einer „core-type“ Bindestelle und einer katalytischen C-terminalen Region, mit einer Typ I

Topoisomerase Aktivität (Kwon et al., 1997; Moitoso de Vargas et al., 1988; Wojciak et al., 2002). Phagen-Integrasen binden an die DNA-Moleküle über charakteristische Rekombinationsstellen bzw. „attachment sites“ (*att*). Die Rekombinationsstelle im bakteriellen Chromosom wird als *attB* und die des Phagen als *attP* bezeichnet (Campbell, 1992; Enquist et al., 1979). Generell ist die *attB* Rekombinationsstelle im Vergleich zu *attP* simpler und besteht aus einer Bindestelle für die Integrase Monomere, die zur *attP* Bindestelle identisch ist, sowie zwei flankierenden Sequenzwiederholungen, den „inverted repeats“ (Sarkar et al., 2001). Die *attP* Rekombinationsstelle ist durch eine Reihe zusätzlicher DNA-Bindestellen wesentlich komplexer (Ross et al., 1979). Neben der „core-type“ Bindestelle und verschiedenen flankierenden „arm-type“ Motiven, verfügt *attP* noch über Erkennungsmotive für weitere Faktoren, die an der Integration und Exzision beteiligt sind (Craig und Nash, 1984; Yin et al., 1985). Einer dieser Faktoren ist das IHF (Integration host factor) Protein, das u. a. wichtige Funktionen bei der Kontrolle der Genexpression, der DNA-Replikation, der Transposition und der Rekombination besitzt (Freundlich et al., 1992). Das IHF-Protein bewirkt in der DNA eine Krümmung, wodurch Rekombinationsstellen in räumliche Nähe gelangen und die Rekombination durch die Integrase ermöglichen (Robertson und Nash, 1988). Die allgemeine IHF-Konsensussequenz WATCAANNNTTR (W = dA oder dT, R = dA oder dG, N = jedes Nukleotid) setzt sich aus einer Kernsequenz, sowie variablen Nukleotidbasen zusammen (Friedman, 1988). Nach der Integration in das bakterielle Genom wird die Phagen DNA auf der rechten und linken Seite von den Rekombinationsstellen *attR* und *attL* flankiert. Für die Exzision des Prophagen ist ein weiterer Faktor, das Xis-Protein erforderlich, dessen spezifische Erkennungssequenzen auf Seiten der *attR* Rekombinationsstelle liegen (Thompson et al., 1987; Yin et al., 1985). Im Gegensatz zu den Integrasen sind die Erkennungsmotive der Rekombinasen Cre und Flp wesentlich einfacher. Die Cre-Rekombinase des Phagen P1 katalysiert die Rekombination an zwei 13 bp langen Erkennungssequenzen, den sogenannten loxP-Stellen (Hoess und Abremski, 1985). Das Cre-Lox-System findet heute auch Anwendung in der Molekulargenetik (Dale und Ow, 1991).

1.9.2 Serin Rekombinasen

Die Proteinfamilie der Serin Rekombinasen wird auch als Invertase/Resolvase Familie bezeichnet. Namensgebend für diese Familie ist der katalytische Serinrest im aktiven Zentrum des Enzyms (Smith und Thorpe, 2002). Vertreter dieser heterogenen Gruppe sind die Invertase Gin des Mu Phagen, die Resolvasen $\gamma\delta$ und Tn3 oder die Phagen-Integrasen ϕ C31, R4, und TP901-1 (Groth und Calos, 2004). Ein weiteres bekanntes Beispiel ist die Hin Rekombinase von *Salmonella*, die eine wichtige Rolle bei der Phasenvariation spielt. Durch die Inversion eines DNA Elements, kann der Erreger zwei unterschiedliche Flagellen Proteine exprimieren (Hughes et al., 1988). Ähnlich zur Tyrosin Familie benötigen auch Serin Rekombinasen spezifische Erkennungssequenzen. Im Gegensatz zu den Integrasen der Tyrosin Familie sind die *att* Rekombinationsstellen der Serin Integrasen weniger komplex. Das Erkennungsmotiv der Phagen-Integrase ϕ C13 besteht aus der Rekombinationsregion TTG und verschiedenen „inverted repeats“ innerhalb von *attB* und *attP* (Thorpe et al., 2000). Auch bei anderen Serin Integrasen, wie z. B. der Phagen R4 und TP901-1 sind die *att* Regionen ähnlich simpel (Olivares et al., 2001; Stoll et al., 2002). Serin Rekombinasen binden an ihre Substrate als Dimer. Für die Rekombination schließen sich zwei Dimere zu einem Tetramer zusammen und bilden mit den gebundenen DNA-Molekülen einen synaptischen Komplex (Leschziner und Grindley, 2003). In diesem aktiven Komplex befinden sich die DNA-Moleküle auf der Außenseite, während die vier Untereinheiten im Zentrum liegen. Die Reaktion beginnt im aktiven Zentrum mit einem nucleophilen Angriff des katalytischen Serin Restes, auf die Phosphodiesterbindung der DNA-Doppelhelix. Im Unterschied zu den Tyrosin Rekombinasen sind bei den Serin Rekombinasen alle vier Monomere gleichzeitig aktiv, wodurch es zu zwei simultanen Doppelstrangbrüchen kommt. Bei der Spaltung wird jeweils ein 5'-Ende des DNA Stranges über ein Serylphosphat kovalent mit den Untereinheiten der Rekombinase verbunden (Abb. 7). Die Spaltung erfolgt um zwei Nukleotide versetzt, wodurch am freien 3'-Hydroxylende kurze 2 bp lange Überhänge entstehen (Reed und Grindley, 1981). Der Strangaustausch erfolgt nach einer Konformationsänderung der Serin Rekombinase. Dabei rotieren die Enzymmonomere und ihre gebundenen Substrate um 180° gegeneinander und ermöglichen auf diese Weise die kreuzweise Verknüpfung der DNA Stränge. Die freie 3'-Hydroxylgruppe greift das Serylphosphat nucleophil an und es folgt die Bildung der Phosphodiesterbindungen, wodurch die Serinreste wieder frei werden. Für eine erfolgreiche Ligation der DNA Stränge spielen die vor allem die 2 bp Überhänge eine wichtige Rolle

(Grindley et al., 2006). Am Ende der Reaktion liegen zwei neu rekombinierte DNA Moleküle vor.

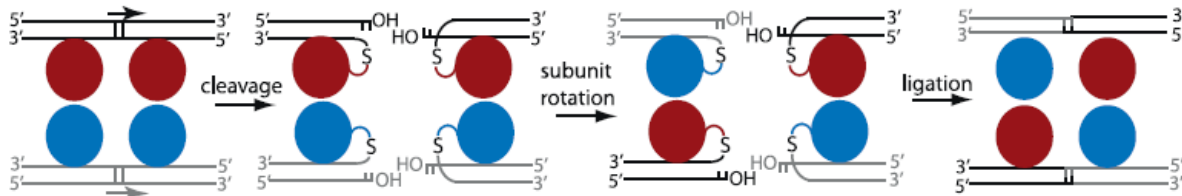


Abb. 7: Mechanismus der Rekombination bei Serin Rekombinasen. Die Enzyme binden als Dimere (zwei rote und zwei blaue Untereinheiten) an ihre DNA Substrate (schwarze bzw. graue Linien). Durch die Bildung eines Tetramers formen sie zusammen mit den beiden DNA-Helices einen synaptischen Komplex. Die vier Untereinheiten sind gleichzeitig aktiv und verursachen im jeweils gebundenen DNA-Molekül einen Doppelstrangbruch. Es entsteht jeweils ein 5'-Phosphoserinrest und ein freies 3'-OH Ende mit einem 2 bp langen Überhang am 3'-Ende. Eine Rotation der Dimere führt zu einer Neuordnung und anschließender Rekombination der beiden DNA-Stränge. (Brown et al., 2011)

1.10 Zielsetzung der Arbeit

Legionella Genome besitzen eine hohe Dynamik, dabei spielen hier vor allem mobile genomische Elemente, horizontaler Gentransfer und Rekombination eine wichtige Rolle. Mobile genetische Elemente, wie z. B. Transposons, temperente Bakteriophagen oder konjugative und integrative Plasmide können über horizontalen Gentransfer in die bakterielle Zelle eingeschleust und dort über den Mechanismus der homologen Rekombination in das Genom eingebaut werden. Bei der Konjugation spielen vor allem Typ IV Sekretionssysteme (T4SS) eine wichtigen Rolle und ermöglichen nicht nur die Sekretion von Proteinen, sondern auch den Transport einzelsträngiger DNA-Moleküle. *L. pneumophila* codiert für verschiedene Typ IV Sekretionssysteme, darunter ein T4BSS bzw. das Dot/Icm System und mehrere unterschiedliche T4ASS. Ein funktionelles T4ASS, das Trb/Tra Konjugationssystem ist bei *L. pneumophila* Corby auf zwei genomischen Inseln (Trb-1, Trb-2) lokalisiert (Glöckner et al., 2008). Zudem verfügt der Stamm *Lp* Corby noch über weitere genomische Inseln (LpcGI-1, LpcGI-2), die für Komponenten der T4SS codieren (Lautner, 2008). Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der genomischen Inseln von *Lp* Corby hinsichtlich ihres Aufbaus, ihrer Funktion und ihrer Verbreitung im Genus *Legionella*. Die Untersuchungen sollten hauptsächlich anhand der beiden genomischen Inseln Trb-1 und LpcGI-2 von *L. pneumophila* Corby erfolgen. Trb-1 und LpcGI-2 unterscheiden sich sowohl in Bezug auf die Existenz

einer *oriT* (origin of transfer) Region, als auch hinsichtlich ihrer genomischen Organisation. Die genomischen Inseln LpcGI-2 und LpcGI-1 sollten zunächst hinsichtlich möglicher zirkulärer episomaler und chromosomaler Formen untersucht werden. Des Weiteren war von Interesse, in wie weit es sich beim putativen T4ASS von LpcGI-2, um ein funktionelles Konjugationssystem handelt und die genomische Insel in andere *Legionella* Stämme konjugiert werden kann. Im Fokus dieser Arbeit stand vor allem die Funktion der ortsspezifischen Integrasen. Durch die Generierung von Integrase Mutanten, sollte sowohl für Trb-1, als auch für LpcGI-2, der Einfluss der Integrasen auf die Prozesse der Integration und Exzision für beide genomischen Inseln analysiert werden. Eine phänotypische Charakterisierung der Integrase Mutanten sollte mittels Konjugationsexperimenten erfolgen. Ein interessanter Aspekt war zudem die Frage nach möglichen Regulationsmechanismen, für die Prozesse der Exzision und Integration der genomischen Inseln. Für Trb-1 sollte anhand von Deletionsmutanten die *Legionella vir* Region (*lvr*) charakterisiert und hinsichtlich einer möglichen regulatorischer Funktion, auf die Exzision der genomischen Insel und die Genexpression der *trb/tra* Gene untersucht werden. *In vivo* Experimente sollten dazu dienen einem möglichen Zusammenhang zwischen der Virulenz von *L. pneumophila* Corby und den codierten T4ASS, nachzugehen. Mittels *in silico* Analyse sollten das Genom bzw. die tRNA Gene von *L. pneumophila* Corby, auf weitere integrative genomische Elementen untersucht werden. Analog zu LpcGI-1 und LpcGI2, sollte für diese Elemente ebenfalls eine Analyse hinsichtlich zirkulärer und chromosomaler Formen erfolgen. Ebenso war im Besonderen auch die Frage nach der Verbreitung der genomischer Inseln im Genus *Legionella* von Interesse. Die bisher sequenzierten *Legionella* Genome sollten in erster Linie mittels *in silico* Analysen auf das Vorhandensein von genomischen Elementen und ihrer Homologie zu den *Lp* Corby spezifischen Inseln untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

2.1.1.1 *Legionella*

Tab. 2: *Legionella* Stämme, Deletionsmutanten und Transkonjuganten (TK), die in dieser Arbeit verwendet bzw. generiert wurden.

Bezeichnung	Charakteristika	Referenz
<i>L. pneumophila</i> Corby	Wildtyp	(Jepras et al., 1985)
<i>L. pneumophila</i> Philadelphia-I JR32	Restriktionsdefizientes Derivat von <i>Lp</i> Phil-I (Sm ^R), Laborstamm	(Marra und Shuman, 1989)
<i>L. oakridgensis</i>	ATCC 33761	C. Lück
<i>L. oakridgensis</i> RV2-2007	Stamm B, Wasserisolat aus England	C. Lück
<i>L. pneumophila</i> Corby, WT ^o	Km ^R -Kassette zw. <i>lpc2816</i> und <i>lpc2817</i>	M. Lautner
<i>L. pneumophila</i> Corby Δ <i>int-1</i>	<i>lpc2818::Km^R</i>	diese Arbeit
<i>L. pneumophila</i> Corby Δ <i>lvrR</i>	<i>lpc2816::Km^R</i>	diese Arbeit
<i>L. pneumophila</i> Corby Δ <i>lvrRABC</i>	<i>lpc2813-2816::Km^R</i>	V. Herrmann
<i>L. pneumophila</i> Corby, WT*	Km ^R -Kassette zw. <i>lpc1856</i> und <i>lpc1857</i>	diese Arbeit
<i>L. pneumophila</i> Corby Δ <i>int1833</i>	<i>lpc1833::Km^R</i>	diese Arbeit
<i>L. pneumophila</i> Corby Δ <i>int1884</i>	<i>lpc1884::Km^R</i>	diese Arbeit
<i>L. pneumophila</i> Corby Δ <i>int2123</i>	<i>lpc2123::Km^R</i>	diese Arbeit
<i>L. pneumophila</i> Corby Δ <i>pilT</i>	<i>lpc1876::Km^R</i>	diese Arbeit
<i>L. pneumophila</i> Phil-I JR32, TK _{WT} ^o	TK aus der Konjugation mit <i>Lp</i> Corby, WT ^o	diese Arbeit
<i>L. pneumophila</i> Phil-I JR32, TK _{Δint-1}	TK aus der Konjugation mit <i>Δint-1</i>	diese Arbeit
<i>L. pneumophila</i> Phil-I JR32, TK _{WT} *	TK aus der Konjugation mit <i>Lp</i> Corby, WT*	diese Arbeit
<i>L. pneumophila</i> Phil-I JR32, TK _{Δlpc1833}	TK aus der Konjugation mit <i>Δlpc1833</i>	diese Arbeit
<i>L. pneumophila</i> Phil-I JR32, TK _{Δlpc2123}	TK aus der Konjugation mit <i>Δlpc2123</i>	diese Arbeit
<i>L. pneumophila</i> Phil-I JR32, TK _{ΔpilT}	TK aus der Konjugation mit <i>ΔpilT</i>	diese Arbeit
<i>L. oakridgensis</i> TK _{WT} ^o	TK aus der Konjugation mit <i>Lp</i> Corby, WT ^o	diese Arbeit

2.1.1.2 *Escherichia*

Tab. 3: *Escherichia coli* Stämme, die in dieser Arbeit für die Zwischenklonierung verwendet wurden.

Bezeichnung	Charakteristika	Referenz
<i>E. coli</i> DH 5α	F ⁻ , Ω80 <i>dlacZ</i> Δ15, Δ(<i>argF lac</i>), U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , (rk ⁻ , mk ⁻), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA69</i> , <i>relA1λ</i> ⁻	(Hanahan, 1983)

2.1.2 Infektionsmodelle

Tab. 4: Infektionsmodelle, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Bezeichnung	Referenz
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	ATCC 30010
U-937	ATCC CRL-1593.2

2.1.3 Vektoren

Tab. 5: Vektoren, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Vektor	Charakteristika	Referenz
pGEM-T Easy	Amp ^R , <i>lacZ</i> -Gen, T7-Promotor	Promega, Mannheim

2.1.4 Rekombinante Plasmide

Tab. 6: Rekombinante Plasmide, die in dieser Arbeit generiert und/oder verwendet wurden. Als Vektor diente immer pGEM-T Easy (Promega).

Plasmid	Charakteristika	Referenz
pChA12	Km ^R -Kassette; Insert: 1400 bp; amplifiziert mit KmR-XbaI-U und KmR-XbaI-R; kann mit <i>XbaI</i> ausgeschnitten werden	C. Albert-Weissenberger
pML12	Insert: 3513 bp; <i>lpc2818</i> ::Km ^R ; amplifiziert mit Int-U und Int-R	M. Lautner
pML14	Insert: 3418 bp, amplifiziert mit pilT-1876-U und pilT-1876-R;	diese Arbeit
pML15	Insert: 2194 bp; ; amplifiziert mit pilT-1876-U und pilT-1876-R; <i>lpc1876</i> deletiert über Inverse-PCR (pML14 als Template) mit pilT-1876-MR und pilT-1876-MUxba; religiertes Plasmid 5209 bp	diese Arbeit
pML16	Insert 3594 bp; <i>lpc1876</i> ::Km ^R ; amplifiziert mit pilT-1876-U und pilT-1876-R	diese Arbeit
pML17	Insert: 2816 bp; amplifiziert mit Int-1884-U und Int-1884-R	diese Arbeit
pML18	Insert: 2034 bp; amplifiziert mit Int-1884-U und Int-1884-R; <i>lpc1884</i> über Inverse-PCR (pML17 als Template) mit Int-1884-MU und Int-1884-MRxba deletiert; religiertes Plasmid: 5049 bp	diese Arbeit
pML19	Insert: 3434 bp; <i>lpc1884</i> ::Km ^R ; amplifiziert mit Int-1884-U und Int-1884-R	diese Arbeit
pML20	Insert 2198 bp; amplifiziert mit GI-2-KmR-U und GI-2-KmR-R	diese Arbeit
pML21	Insert: 2096 bp; amplifiziert mit GI-2-KmR-U und GI-2-KmR-R; Inverse-PCR (pML20 als Template) mit GI-2-KmR-MU und GI-2-KmR-MRxba; religiertes Plasmid: 5112 bp; <i>XbaI</i> Schnittstelle zw. <i>lpc1856</i> und <i>lpc1857</i>	diese Arbeit
pML22b	Insert: 3096 bp; amplifiziert mit GI-2-KmR-U und GI-2-KmR-R; Km ^R -Kassette zwischen <i>lpc1856</i> und <i>lpc1857</i>	diese Arbeit
pML23	Insert: 3103 bp; amplifiziert mit Int-1833-U und Int-1833-R	diese Arbeit
pML24	Insert: 2018 bp; amplifiziert mit Int-1833-U und Int-1833-R; <i>lpc1833</i> deletiert über Inverse-PCR (pML23 als Template) mit Int-1833-MU und Int-1833-MRxba; religiertes Plasmid: 5039 bp	diese Arbeit
pML25a	Insert 3418 bp; <i>lpc1833</i> ::Km ^R ; amplifiziert mit Int-1833-U und Int-1833-R	diese Arbeit
pML26	Insert: 2377 bp; amplifiziert mit Int2123-U und Int2123-R	diese Arbeit
pML27	Insert: 2095 bp; amplifiziert mit Int2123-U und Int2123-R; <i>lpc2123</i> über Inverse-PCR (pML26 als Template) mit Int2123-MU ^{sacII} und Int2123-MRxba deletiert; religiertes Plasmid: 5110 bp	diese Arbeit
pML28	Insert: 3495 bp; <i>lpc2123</i> ::Km ^R ; amplifiziert mit Int2123-U und Int2123-R	diese Arbeit
pML54	Insert: 2530 bp; amplifiziert mit LvrR-2816-U und LvrR-2816-R	diese Arbeit
pML56	Insert: 1914 bp; amplifiziert mit LvrR-2816-U und LvrR-2816-R; <i>lpc2816</i> (<i>lvrR</i>) deletiert über Inverse-PCR (pML54 als Template) mit LvrR-2816-MUxba und LvrC-2816-MR; religiertes Plasmid: 4929 bp	diese Arbeit
pML58	Insert: 3314 bp; <i>lpc2816</i> ::Km ^R ; amplifiziert mit LvrR-2816-U und LvrR-2816-R	diese Arbeit

2.1.5 Oligonukleotide

Tab. 7: Oligonukleotide (Primer), die in dieser Arbeit verwendet wurden. Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte durch die Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg.

Name	T _m [°C]	Sequenz (5'→3')
Herstellung der Deletionsmutanten		
GI-2-KmR-U	61,0	CTAATACCACGACGAATACCGATC
GI-2-KmR-R	59,3	CAACCGTTCAAGCCAATATAG
GI-2-KmR-MU	58,9	CGCATTAACACCTGGCTAAAATC
GI-2-KmR-MRxba	59,7	CAATACCCATCTAGAGCAACTAACA
GI-2-KmR-Rout	59,3	ACAGATGTTTAACCTCACTGATCG
Int-U	54,2	CTAAAAGCTTACGTTGTAATTATG
Int-R	63,2	AAGAGCTCGTATGCTTGCTGGCTTAT
Int-MU	57,1	GCATAAAGTGAATGCCGTTAGAA
Int-MRxba	55,9	GATCTAGATCATGAACTTCGTATT
Int-Uin	60,3	GTTATGACAGCAGCTCAAGCTC
Int-Rin	60,3	CTCAGCGTACTGGCAATATCAG
Int-Rout	61,0	AGAGGCATCCTTACACTCATAACG
Int-1833-U	58,9	GCTAACTTGCGTCTTGATTTTC
Int-1833-R	58,1	GAAGATTGATACGTTTGGAATCTA
Int-1833-MU	59,7	CCATTTACCCATACTCCTTTGATTG
Int-1833-MRxba	57,1	GCGTAATCTAGATTTGAGAATGC
Int-1833-Uin	58,4	CTGCATCATCATGAAGACTACG
Int-1833-Rout	58,9	CAACTCCTATAGTGATGATGTGG
Int-1884-U	62,7	GAGGCAAGCTTCGCAACATCATTG
Int-1884-R	59,3	CAACACTAGTTCGTAGAGACTTTG
Int-1884-MU	61,0	GATTGACTGGCATAGGAGTGGTTA
Int-1884-MRxba	60,1	CGCATATCTAGAACAAAGGATCTATTG
Int-1884-Uout	63,2	CAAATCCTCCGGTATTGTACTGCTGT
Int-1884-Rin	58,4	AGACGATATAGAGAGCTAACCC
Int-2123-U	60,3	TGCTTCAAGCGCCTCTTTAGTG
Int-2123-R	60,3	AAGCGAAGCTTTACTCAAGCCG
Int-2123-MU	63,0	CTTCCGCGGTCCATTAACACATAGA
Int-2123-MRxba	61,9	GCTAAAGCATCTAGAAAGGGGATAATTC
Int-2123-Uout	60,6	AAGGTTGGTCATCACACACTACC
Int-2123-Rin	61,0	TAGCCTTGATTTGCCTGCTTATGC

LvrR-2816-U	59,3	GGATATGGTGAATTTGTCAGAAGG
LvrR-2816-R	61,0	CTCCTGCGTTACTTCGATTTTGAC
LvrR-2816-MUxba	61,0	GCGTTGTCCCATTCTAGAACTATC
LvrR-2816-MR	60,6	CAAAC TAGGGC ATACGATCAACC
LvrR-2816-Uin	57,9	GAATCAGTATCCATACGCTCC
LvrR-2816-Rin	57,3	CTGCTGACATAACGGGATCA
LvrRABC-U	59,8	GAGTCGAATGGAAGTCCTCCA
LvrRABC-R	58,9	ACTTAATGCCGATGGTGCTATTG
LvrRABC-MUxba	58,5	GCTTCTAGAACAAATTCCTGAGAATT
LvrRABC-MR	60,6	GGCATACGATCAACCCAATCTAC
LvrRABC-Uout	64,8	CATGGCTGAGACTCGATTGCTGTCAT
LvrRABC-Rout	65,0	TCACTGATGACCAAGGCAGTTGAATGG
pilT-1876-MR	60,6	GCAGTCTATGCGAAACCTGATTC
pilT-1876-MUxba	61,0	GTACATCTAGATTGGATGAGCCAC
pilT-1876-R	61,0	GCTGAATTCCTTG CAGAACA ACTC
pilT-1876-U	62,4	GTCTTCTGAGCTCAACTGCGAAC
pilT-1876-Rout	63,4	GCTATTACCCAAAACGTCACCGATATG
pilT-1876-Uin	62,7	GACTATCCGACACAGAAAGCATGC
Km ^R -Kassette		
KmR-XbaI-U	65,5	TGAATGTCAGCTTCTAGACTATCTGGACAAG
KmR-XbaI-R	72,2	GCGGCCATCGTGCTAGACACTCCTGGAGT
MCS (Multiple cloning site)		
M13-R	54,5	GGAAACAGCTATGACCATG
M13-U	52,8	GTAAAACGACGGCCAGT
Charakterisierung der genomischen Inseln		
Loak-lvh-2R	57,1	GAAATCCACACTATCTACTGAAG
Loak-lvh-3U	57,1	CAGAGTCAATTAATAGCAACGGA
Loak-lvh-5U	58,4	ACTGAACTGATGAGGAGCAAAC
LpcGI-1-1U	60,6	CATCTGCACCAATGTTCAAGCTG
LpcGI-1-2R	61,0	CGCTTTAGCAAGATATTCACGAGC
LpcGI-1-3U	63,2	GGATGGCAGTAATATACATAGGCTCC
LpcGI-1-4R	60,6	GTGTTCAACTACTGCATGCTACC
LpcGI-1-5R	60,1	GCGATCTCTGGTTATTGATAACATTG
LpcGI-1-6U	61,0	GAGCAAACATTCACGAGGAGTGAT
LpcGI-2-1U	61,3	GCCATCTATCAATTCAGCAAGAGC

LpcGI-2-2R	63,4	CTGCATGAATAGAACCACGATATCGAC
LpcGI-2-3U	60,6	AGGTCACGTAAAAGTCACGCAAG
LpcGI-2-4R	60,1	GGAAGAAGTTGGTAAACAATTTGACG
LpcGI-2-5R	61,6	CATTGCCACAAATTTAGTCGAGAAGT
LpcGI-2-6U	61,9	GAATATCTCAAAGAGCTTTCTGCACTG
LpcGI-Asn-1U	59,3	GTCGCATAAGTTTCAATGCTATGG
LpcGI-Asn-2R	59,3	GCTAATATCTTTGGTTTGCACGTC
LpcGI-Asn-3U	58,9	GTATCCCGATTAAAGAGTTCTGC
LpcGI-Asn-4R	58,9	CTTTACGAACATCCTCAATGCCT
LpcGI-Phe-1U	58,4	GTCATAGGTTATGCCACAGACA
LpcGI-Phe-2R	59,3	GCATGAGTGTCGTAAAGTAATACC
LpcGI-Phe-3U	59,7	CATCTTCAAGCTGATATTCATGTGC
LpcGI-Phe-4R	59,3	GACAAGCCTATTACTCAACTCATC
trb-1	59,8	TTCGATATCGCCGTCTGCCAT
trb-2	57,6	AGATTGCTCATCAATCAAACCTTCC
trb-3	58,1	GTAAGCCTATCTATTGATAATGCAC
trb-4	56,7	GAGAAGGTCGATGGTGATC
trb-6	64,8	GCATGGTTCATAGCTCAACGTTGGAG
trb-7	61,0	GTTGTAAAGTAGTGTTGGCCTTGG
Sequenzierung von Trb-1		
TrbI-F	56,5	TAAGGAGTGAGACTGATGAATC
TrbI-R	58,9	CATTGCACTCCTCCTGTATCAAT
lpc2805-R	62,4	GAGCTACGACTGGTACTTTGTGG
lpc2807-F	59,8	ATCCTCGGATGGATCAGTCAG
lpc2807-R	55,9	ATGGATGGCTCAACAATGAAG
lpc2809-F	59,3	ACCCAATCTATATGCAAGAGATCC
Charakterisierung der Transkonjuganten		
lpg0402-U	59,7	GATGATCGAATTAGGATTACCATCC
lpg0402-R	59,3	GACATTGATGCAATCAACACCTTC
TraG-F	60,3	TGGAGACGGTCAATGAGCTTGA
TraG-R	59,3	TAGTCTGATTTCCTCATCTTCACG
TraM-F	57,3	GTTATCACTGGTGGTCAAGC
TraM-R	57,9	TGGATGCATGAGTTATCTCGC
Loak-lvhB4-U	61,0	GAAGGGCAATAGTGAGTTGTCTGA
Loak-lvhB4-R	60,6	GATATAGGAGCTGTTACCGGAAG

Loak-orf0933-U	59,3	AGTCACCATAGGTCATAACGTCAA
Loak-orf0933-R	59,3	TGCCTACACACTGTTTCAGCTATT
lpc1833-U	61,0	AAGTCCTTGCGTGACTTTTACGTG
lpc1833-R	58,9	AGCAACCAATCAAAGGAGTATGG
lpc1850-U	59,4	CGCCAGCAGTGAAAGAAGTG
lpc1850-R	59,4	CAAGCCATCCCCTAAGCATC
lpc1884-U	57,9	CGCTTTTGGAGTTATCTGCATG
lpc1884-R	57,6	CACGTTTGATTGATTTTCATCCAC
lpc2123-U	60,3	AGAGAAGTCCTAGGGGATGTAG
lpc2123-R	58,1	AAGAAATACATCTTGCCTATGTCTG
trnM-lpg2362-R	59,2	CAGTCTGAAAGAAAGCCCTTTTGA
trnM-lpg2362-U	61,0	GACGACTCTCATCTGGGTGATTTT
Kontrolle der RNA-Proben auf DNA-Rückstände		
RT-GyrA-F	61,0	GCCAAAGAAGTCTTACCAGTCAAC
RT-GyrA-R	60,6	CGCAATACCGGAAGAGCCATTAA
Real-time PCR		
RT-flaA-U	55,3	CAATTTTCAGTATCGGCAGCA
RT-flaA-R	55,3	CCGGTAAAATTGGCAGAAGA
RT-gyrA-U	59,4	TGACAGTCTCGTTGGAGTCG
RT-gyrA-R	55,3	CAAGGGATTTAACGGCTTGA
RT-LpcGI-2-1U	60,3	GGAAAGAGCCTAAAATTTCGCCC
RT-LpcGI-2-2R	60,3	GTGTTTGAGTACGACGCAGTAC
RT-LpcGI-2-3U	60,6	AGGTCACGTAAAAGTCACGCAAG
RT-LpcGI-2-5R	60,3	CCCACATCTGCAAGCACAAGTA
RT-lpc2784-U	57,3	CCCATGGAATCAAGCCAGTT
RT-lpc2784-R	55,3	ACACCATCCTTCTAAAGAGG
RT-lpc2785-U	56,7	GGGCGCTATGGTATATGTG
RT-lpc2785-R	55,3	CCAACTTCGGTTTCACGTTT
RT-lpc2790-U	56,7	GTCTGACATGCTGGTGACA
RT-lpc2790-R	57,3	ACCAAAACGACCATCCATCC
RT-lpc2795-U	57,1	CTGGTCTTTTATAATGAAGCAGG
RT-lpc2795-R	55,9	TTGCCTGGATCTTTCAGTACT
RT-lpc2796-U	56,7	GGCAGCGCAATATACAGGT
RT-lpc2796-R	55,3	TTCATCCGGCTTGAATTGAG
RT-lpc2801-U	55,3	AACTTAAAAGTCGTGAGCGC

RT-lpc2801-R	55,3	GTTTACCGCTAGTAGTGGTA
RT-lpc2812-U	56,7	TATCAATGAGGTGCGTGCC
RT-lpc2812-R	57,3	GAATAGCGAATGTAGGGCGT
RT-lpc2813-U	54,5	GGGGTATCAAAACGATGAG
RT-lpc2813-R	54,7	AGCTGCTTTATCTACAAACTTG
RT-lpc2818-U	57,3	CTGATGACCAAGGCAGTTGA
RT-lpc2818-R	57,3	ATCAGCCGGAGTTGATTGTC
RT-lpc2819-U	57,3	CCAAATCGACTATGGCCTGA
RT-lpc2819-R	55,3	ATGCATTCTTGCGGTGTTTG
RT-trb-2R	58,4	CACATTCAATTTGCACCCTGTG
RT-trb-3U	56,5	CAAGGAGTTATTGTTCATGGAG

2.1.6 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen AppliChem, Darmstadt; Becton Dickinson, Heidelberg; Biorad, München; Dianova, Hamburg; Fermentas, St. Leon-Rot; GE Healthcare/Amersham Biosciences, München; Gerbu, Gaiberg; Invitrogen, Karlsruhe; Merck, Darmstadt; New England Biolabs, Frankfurt a.M.; Oxoid, Wesel; Promega, Mannheim; Qiagen, Hilden; Roche, Mannheim; Roth, Karlsruhe; Serva, Heidelberg; Sigma-Aldrich, München, Thermo Scientific, Bonn; VWR International, Nürnberg, bezogen.

2.1.7 Medien, Nährböden und Medienzusätze

Alle Medien für Nährböden (LB-Agar, BCYE-Agar) und das LB-Flüssigmedium wurden durch autoklavieren bei 121°C sterilisiert. Das YEB-Flüssigmedium und alle hitzelabilen Zusätze (Antibiotika, L-Cystein, FeNO_3 und $\text{Fe}_4(\text{P}_2\text{O}_7)_3$ wurden steril filtriert (0,2 μm Filter) und dem Medium bei Raumtemperatur (Flüssigmedium) bzw. bei ca. 45°C (Agar) zugefügt.

2.1.7.1 Kultivierung von *E. coli*

E. coli Bakterien wurden in LB-Medium oder auf LB-Agarplatten bei 37°C kultiviert. Das im Medium enthaltene Hefeextrakt diente als Nährstoffquelle und lieferte Peptide, Aminosäuren, Purine, Pyrimidine und Vitamine. Der Medienzusatz Bacto Trypton lieferte Peptide, Aminosäuren und Natriumchlorid (NaCl).

LB-Flüssigmedium

Bacto Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
ad 1 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$	
→ autoklavieren	

LB-Agar

Bacto Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
Agar	12 g
ad 1 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$	
→ autoklavieren	

2.1.7.2 Kultivierung von *Legionella*

Legionella Stämme wurden in YEB-Flüssigmedium oder auf BCYE-Agarplatten im Brutschrank bei 37°C kultiviert. Das im Medium und Agar enthaltene Hefeextrakt diente als Nährstoffquelle, ACES fungierte als Puffer und durch die Aktivkohle wurden toxische Sauerstoffradikale inaktiviert. Die Aminosäure L-Cystein wurde von den Bakterien als Energie- und Kohlenstoffquelle genutzt und ermöglichte die Aufnahme von Eisen. Das Eisen wurde den Bakterien in Form von Eisen(III)-nitrat (FeNO_3) oder als Eisen(III)-pyrophosphat ($\text{Fe}_4(\text{P}_2\text{O}_7)_3$) zur Verfügung gestellt.

YEB-Flüssigmedium

ACES 10 g

Hefeextrakt 10 g

ad 1 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$

Der pH-Wert wurde auf 6,9 mit 10 M KOH eingestellt.

L-Cystein 0,4 g

$\text{Fe}_4(\text{P}_2\text{O}_7)_3$ 0,25 g

Die Lösung wurde in eine autoklavierte Flasche steril filtriert.

BCYE-Agar

ACES 10 g

Hefeextrakt 10 g

ad 1 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$

Der pH-Wert wurde auf 6,9 mit 10 M KOH eingestellt.

Aktivkohle 2,5 g

Agar 15 g

→ autoklaviert

L-Cystein 0,4 g in 10 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$, steril filtriert

FeNO_3 0,25 g in 10 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$, steril filtriert

2.1.7.3 Kultivierung von U-937 Zellen

Die U-937 Zelllinie wurde in RPMI + 10 % FCS bei 37°C und 5 % CO_2 in kleinen Zellkulturflaschen inkubiert. Die Zellen wurden nach 3 bzw. 4 Tagen in einer 1:10 bzw. 1:12 Verdünnung in neues Medium überführt.

2.1.7.4 Kultivierung von *Acanthamoeba castellanii*

Acanthamoeba castellanii ATCC 30010 wurde in PYG-Wachstumsmedium in Zellkulturflaschen, bei Raumtemperatur kultiviert.

PYG-Wachstumsmedium

Proteose Pepton	20 g
Hefeextrakt	1 g
Natriumcitrat x2H ₂ O	1 g
0,4M MgSO ₄ x7H ₂ O	10 ml
0,25M Na ₂ HPO ₄ x7H ₂ O	10 ml
0,25M KH ₂ PO ₄	10 ml
0,05M CaCl ₂ x2H ₂ O	8 ml
ad 940 ml H ₂ O _{dd} , autoklavieren, dann Zugabe von	
0,005M Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ x6H ₂ O	10 ml
2M Glucose	50 ml

2.1.7.5 Antibiotika und andere Medienzusätze

Tab. 8: In dieser Arbeit verwendete Antibiotika und die jeweils eingesetzte Konzentration bei *Legionella* und *E. coli*. Alle Antibiotika wurden nach dem Lösen in entsprechendem Lösungsmittel, bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

	Lösungsmittel	für <i>Legionella</i> [µg/ml]		für <i>E. coli</i> [µg/ml]	
		Medium	Nährboden	Medium	Nährboden
Ampicillin (100 mg/ml)	H ₂ O _{dd}	---	---	100	100
Kanamycin (40 mg/ml)	H ₂ O _{dd}	10	12,5	40	40
Streptomycin (100 mg/ml)	H ₂ O _{dd}	50	50	---	---

weitere Zusätze in LB-Nährböden:

Tab. 9: In dieser Arbeit verwendete Zusätze in LB-Nährböden. Die Lagerung erfolgte bei -20°C. X-Gal wurde nach dem Lösen in Dimethylformamid lichtgeschützt in einem Polypropylengefäß gelagert.

Bezeichnung	Lösungsmittel	Konz.
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)	H ₂ O _{dd}	100 mM
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid)	Dimethylformamid	2 %

2.1.8 Enzyme

Tab. 10: Enzyme, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Enzym	Charakteristika	Hersteller
HotStar HiFidelity DNA Polymerase	DNA Polymerase	Qiagen
HotStarTaq DNA Polymerase	DNA Polymerase	Qiagen
KAPAHiFi DNA Polymerase	DNA Polymerase	Peqlab
Taq DNA Polymerase	DNA Polymerase	Invitex
TopTaq DNA Polymerase	DNA Polymerase	Qiagen
T4 DNA Ligase	DNA Ligase	New England Biolabs
DNase I	DNase	Sigma
<i>Xba</i> I	Restriktionsendonuklease	New England Biolabs

2.1.9 Laborkits

Tab. 11: Auflistung der Laborkits, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Laborkit	Hersteller
DNasy [®] Blood & Tissue Kit	Qiagen
EXPRESS SYBR [®] GreenER [™] qPCR SuperMix Universal Kit	Invitrogen
Generation [™] Capture Column Kit	Qiagen
High Pure RNA Isolation Kit	Roche
Invisorb [®] Spin Plasmid Mini Two	Invitex
MSB [®] Spin PCRapace	Invitex
pGEM [®] -T Easy Vector Systems	Promega
Rapid DNA Ligation Kit	Fermentas
RNase-Free Dnase Set	Qiagen
Rneasy Mini Kit	Qiagen
SuperScript [®] VILO [™] cDNA Synthesis Kit	Invitrogen
Wizard [®] SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega

2.1.10 DNA Größenstandard

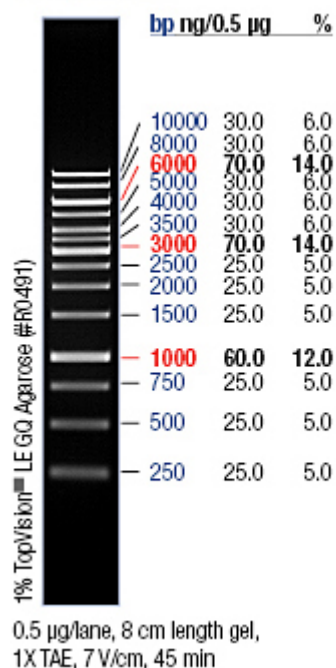


Abb. 8: DNA Größenstandard, der in dieser Arbeit verwendet wurde. Zur Bestimmung der Größe von DNA Fragmenten in Agarosegelen diente eine „1 kb DNA Ladder“ von Fermentas. Auf ein 0,9 %-iges Agarosegel wurden 10 µl des Größenstandards aufgetragen.

2.1.11 Geräte

Tab. 12: Geräte, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.

Gerät	Bezeichnung/Hersteller
Autoklav	Webeco
Brutschrank (30°C)	Memmert
Brutschrank (37°C)	Heraeus
Brutschrank (37°C, CO ₂ belüftet)	Binder
DNA-Sequenzierer	ABI PRISM [®] 3130 Genetic Analyzer
Eismaschine	Scotsman AF80
Elektrophoresekammer	Sub-Cell [®] Model 192, Bio-rad
Elektroporator	Gene Pulse Xcell, Bio-rad
Feinwaage	Kern PLJ
Geldokumentationsanlage	AlphaImager [™] 2200
Gefrierschrank (-20°C)	Privileg ProComfort
Gefrierschrank (-80°C)	Sanyo Ultra Low

Grobwaage	Kern PLS 2100-2
Heizblock	Dry Block Heating Thermostat, Bio TDB-100
Koloniezähler	Acolyte colony counter, dw scientific
Kühlschrank	Privileg
Kühlzentrifuge (groß)	Heraeus Multifuge 1L-R, Thermo Scientific
Kühlzentrifuge (klein)	Centrifuge 5417 R, Eppendorf
Magnetrührer	Biomagnetic Stirrer HMS-3000
Mikrowelle	Privileg
Nano Drop Spektrophotometer ND1000	Peqlab Biotechnologie GmbH
Netzgerät	Bio-rad
PCR Gerät	Thermocycler T3000, Biometra®
pH-Messgerät	Mettler Toledo FiveEasy™
Photometer	Genesys 10 BN, Thermo Scientific
Pipetten	Eppendorf Research
Plattiergerät	Wasp-2, dw scientific
Real-Time PCR Gerät	Mx3000P™, Stratagene
Schüttler (klein)	SM-30, EB Edmund Bühler GmbH
Schüttler (groß)	Incubator Shaker Model 25, New Brunswick Scientific CO. INC
Sterilwerkbank	Hera Safe KS
Thermomixer	Thermomixer comfort, Eppendorf
Tischzentrifuge	Centrifuge 5424, Eppendorf
Tischzentrifuge (klein)	MC-6400-Centrifuge,
Vortexer	LMS Laboratory & Medical Supplies
Wasserbad	GFL

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung und Konservierung von Bakterien

2.2.1.1 Kultivierung von *E. coli*

Für die Kultivierung von *E. coli* auf Nährböden, diente LB-Agar. Die Bakterien wurden auf LB-Agarplatten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht im Brutschrank kultiviert. Die Anzucht von *E. coli* Flüssigkulturen erfolgte in LB-Medium bei 37°C im Schüttler.

2.2.1.2 Kultivierung von *Legionella*

Für die Kultivierung von *Legionella* Stämmen auf Nährböden diente BCEY-Agar. Legionellen wurden auf den BCYE-Agarplatten bei 37°C 2-3 Tage im Brutschrank kultiviert. Die Anzucht von *Legionella*-Flüssigkulturen erfolgte in YEB-Medium. Zunächst wurde eine 4 ml Vorkultur angesetzt, hierfür wurde mit einer Impföse etwas Bakterienmaterial von einer Agarplatte abgenommen und im Flüssigmedium resuspendiert. Die Vorkultur wurde bei 37°C über Nacht im Schüttler inkubiert. Für die Hauptkultur wurden 3 ml der Vorkultur mit YEB-Medium auf eine OD₆₀₀ ~ 0,3 eingestellt. Die Hauptkultur wurde unter Schütteln bei 37°C bis zur gewünschten OD₆₀₀ kultiviert.

2.2.1.3 Anlegen von Glycerinkulturen

Die Konservierung der Bakterien erfolgte in 20 %-igem Glycerin. Die Bakterien wurden 1 (*E. coli*) bis 3 Tage (*Legionella*) auf Agarplatten bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurden die Kulturen mit einer Impföse von der Agarplatte, in ein steriles Cryoröhrchen überführt und in 500 µl 20 %-igem Glycerin resuspendiert. Die Lagerung der Glycerinkulturen erfolgte bei -80°C.

2.2.2 Nukleinsäure Techniken

2.2.2.1 Isolierung chromosomaler DNA aus Bakterien für die PCR

Die Isolierung von chromosomaler DNA für die PCR erfolgte mit dem „Generation Capture Column Kit“ (Qiagen). Die Legionellen wurden zunächst auf BCYE Agarplatten für 2 bis 3 Tage bei 37°C kultiviert. Anschließend wurde in 4 ml YEB-Medium eine Übernachtskultur mit Legionellen angeimpft und ebenfalls bei 37°C unter Schütteln kultiviert. Für die Gewinnung der chromosomalen DNA wurde 1 ml der Übernachtskultur ($1-3 \times 10^9$ Zellen/ml) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei $16000 \times g$ für 5 min zentrifugiert. Vom Überstand wurden 800 µl entfernt, das Pellet wurde in den verbliebenen 200 µl resuspendiert und das Gemisch wurde auf ein spezielles Säulchen nach Herstellerangaben aufgetragen. Die Adsorption der DNA erfolgte bei Raumtemperatur für 1 h. Im Anschluss wurden 400 µl „DNA Purification Solution 1“ auf das Säulchen aufgetragen, bei Raumtemperatur (RT) für 1 min inkubiert und danach bei $10000 \times g$ für 10 s abzentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, das Säulchen wurde in ein neues Auffanggefäß platziert und der Waschschrift wurde ein weiteres Mal wiederholt. Anschließend wurden 200 µl der „DNA Elution Solution 2“ aufgetragen und erneut bei $10000 \times g$ für 10 s zentrifugiert. Zum eluieren der DNA wurde das Säulchen auf ein sauberes Reaktionsgefäß platziert, es wurden 100 µl „DNA Elution Solution 2“ aufgetragen, bei 100°C für 10 min im Heizblock inkubiert und direkt im Anschluss bei $12000 \times g$ für 30 s zentrifugiert. Die chromosomale DNA wurde im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

2.2.2.2 Isolierung chromosomaler DNA aus Bakterien für die Real-time PCR

Bakterielle genomische DNA, die in der Real-time PCR verwendet wurde, wurde mit dem „DNeasy Blood & Tissue Kit“ (Qiagen) isoliert. Die Legionellen wurden zunächst 2 bis 3 Tage auf BCYE Agarplatten bei 37°C kultiviert. Die Vorkultur wurde in 4 ml YEB angeimpft und unter schütteln bei 37°C über Nacht kultiviert. Für die Hauptkultur wurden 3 ml der Vorkultur mit YEB auf eine $OD_{600} = 0,3$ eingestellt und bis zur gewünschten OD_{600} bei 37°C im Schüttler inkubiert. Es wurden jeweils Proben aus der exponentiellen ($OD_{600} \sim 1,0$) und stationären ($OD_{600} \sim 2,1$) Phase genommen. Die Proben aus der stationären Phase wurden vor der weiteren Verwendung, mit YEB zunächst auf eine $OD_{600} \sim 1,0$ verdünnt. Zum Isolieren der chromosomalen DNA wurden 2 ml Bakterienkultur bei $5000 \times g$ (7500 rpm) pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet wurde in 180 µl ATL Puffer

resuspendiert. Zum Lysieren der Bakterien wurden 20 µl Proteinase K zugegeben, der Mix wurde sorgfältig gemischt und bei 56°C für 3 h im Heizblock inkubiert. Anschließend wurde die Probe 15 sec mittels Vortexer gemischt. Es wurden 200 µl AL Puffer zugegeben, gemischt und dann mit 200 µl Ethanol (96-100%) erneut gemischt. Die Probe wurde auf ein spezielles „DNeasy Mini“-Säulchen aufgetragen und bei 6000 x g (8000 rpm) für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Zum Waschen wurden zunächst 500 µl AW1 Puffer auf das Säulchen aufgetragen, bei 6000 x g (8000 rpm) für 1 min zentrifugiert und der Überstand wurde erneut verworfen. Auf das Säulchen wurden 500 µl AW2 Puffer pipettiert und zum Trocknen der Membran wurde die Probe bei 20000 x g (14000 rpm) für 3 min zentrifugiert. Das Säulchen wurde anschließend auf ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß platziert. Zum eluieren der DNA, wurden 200 µl AE Puffer auf die Membran der Säulchen pipettiert, bei Raumtemperatur für 1 min inkubiert und dann bei 6000 x g (8000 rpm) für 1 min zentrifugiert. Die chromosomale DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

2.2.2.3 Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli*

Für die Isolierung von Plasmid DNA aus einer *E. coli* Kultur wurde das „Invisorb Spin Plasmid Mini Two“ (Invitek) Laborkit verwendet. Von einer *E. coli* Übernachtskultur wurden 2 ml in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 16500 x g für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 250 µl „Solution A“ resuspendiert. Zum Lysieren der bakteriellen Zellen wurde das Gemisch mit 250 µl „Solution B“ versetzt und 5-mal invertiert. Nach Zugabe von 250 µl „Solution C“ wurde das Gemisch 5-mal invertiert und dann bei 16000 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, auf ein Säulchen aufgetragen und bei Raumtemperatur für 1 min inkubiert. Beim Zentrifugieren (10000 x g, 1 min) wurde die Plasmid DNA an die Membran des Säulchens gebunden. Der Durchfluss wurde verworfen und das Säulchen wurde mit 750 µl „Wash Solution“ gewaschen (10000 x g, 1 min). Um Reste von Ethanol zu entfernen wurde das Säulchen ein weiteres Mal bei 16500 x g für 3 min zentrifugiert. Die Plasmid DNA wurde mit 60 µl H₂O_{dd} eluiert. Hierfür wurden die Säulchen auf ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß platziert und mit H₂O_{dd} beladen. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurde die Probe bei Raumtemperatur und 10000 x g für 1 min zentrifugiert. Die Plasmid DNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.2.4 Isolierung von Gesamt-RNA aus Bakterien

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus Bakterien wurde das „High Pure RNA Isolation Kit“ von Roche verwendet. Die RNA wurde aus der exponentiellen und postexponentiellen Wachstumsphase aus je 1 ml Bakterienkultur isoliert. Die Bakterien wurden bei 2000 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde restlos abgenommen und das Pellet wurde in 200 µl 10 mM Tris (pH 8,0) resuspendiert. Es wurden 4 µl Lysozym (50 mg/ml) hinzugegeben und der Ansatz wurde bei 37°C für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit je 400 µl „Lysis/-Binding“ Puffer gemischt und auf ein High Pure Filtersäulchen aufgetragen. Die Proben wurden bei 8000 x g für 15 sec zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Proben wurden mit je 500 µl Wasch-Puffer I und Wasch-Puffer II gewaschen (8000 x g, 15 sec). Ein dritter Waschschrift erfolgte mit 200 µl Wasch-Puffer II bei 13000 x g für 2 min. Das Filtersäulchen wurde auf ein RNase freies 1,5 ml Reaktionsgefäß platziert. Die RNA wurde mit 90 µl Elution Puffer eluiert (8000 x g, 1 min). Die Proben wurden bei -80°C gelagert.

2.2.2.5 DNase I Verdau von RNA

Der DNase I Verdau diente zum Entfernen von DNA Kontaminationen aus den RNA-Proben. Es wurde das „RNase-Free DNase Set“ von Qiagen verwendet. Die Reaktion erfolgte bei Raumtemperatur (20-25°C) für 30 min. Anschließend wurde die RNA aufgereinigt.

Reaktionsansatz:	RNA Lösung	x µl
	10x Puffer RDD	10 µl
	DNase I	5 µl
	ad 100 µl H ₂ O _{dd} (DEPC)	

2.2.2.6 Aufreinigung von RNA

Nach dem DNase I Verdau wurden die RNA-Proben mit dem „RNeasy Mini Kit“ von Qiagen aufgereinigt. Eine 100 µl RNA-Probe wurde mit 350 µl RTL Puffer versetzt. Es wurden 250 µl Ethanol (96-100%) hinzugefügt und die Probe wurde durch pipettieren gut gemischt. Zum Binden der RNA wurde das Gemisch auf die Membran eines RNeasy Mini Säulchens transferiert und bei 10000 rpm für 15 sec zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und

die Membran wurde zweimal mit je 500 µl RPE Puffer gewaschen (10000 rpm, 15 sec bzw. 2 min für den zweiten Waschschrift). Zum Trocknen der Membran wurde das Säulchen auf ein sauberes 2 ml Reaktionsgefäß platziert und bei 14000 rpm für 1 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Säulchen auf ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß platziert und die RNA wurde mit 40 µl RNase-freiem Wasser eluiert (10000 rpm, 1 min). Die RNA-Proben wurden bei -80°C gelagert.

2.2.2.7 Die Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) wurde zur Vervielfältigung von DNA eingesetzt. Für die Amplifikation der bakteriellen chromosomalen DNA bzw. der Plasmid DNA wurde eine DNA Polymerase verwendet. Als Starterkennung für die Polymerase dienten zur Template-DNA komplementäre Oligonukleotide (Primer). Die Primersequenz wurde so gewählt, dass einer der Primer am „sense“-Strang und der andere Primer am komplementären DNA-Strang hybridisierte. Ein 50 µl Reaktionsansatz wurde in einem PCR-Reaktionsgefäß, wie nachfolgend beschrieben angesetzt.

Tab. 13: Reaktionsansätze für verwendete DNA Polymerasen.

	TopTaq	HotStarTaq	HotStar HiFidelity
DNA Polymerase (5U/µl)	0,5 µl	0,25 µl	1,0 – 2,0 µl
5x Q-Solution	10,0 µl	10,0 µl	10,0 µl
10x PCR Puffer	5,0 µl	5,0 µl	---
5x HotStar HiFidelity PCR Puffer	---	---	10,0 µl
dNTP Mix (10 mM)	0,5 µl	1,0 µl	---
Primer-U	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
Primer-R	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
Template	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl
ad 50 µl H ₂ O _{dd}			

Die PCR-Reaktion bestand aus drei Reaktionsschritten, der Denaturierung der DNA Doppelstränge, dem Anlagern der Primer (Annealing) an die Einzelstränge und der Neusynthese (Elongation des Doppelstrangs). Die Reaktionsschritte 2 bis 4 (Denaturierung, Annealing und Elongation) wurden während der PCR in 30 bis 40 Zyklen wiederholt.

PCR-Reaktion:	1. Initiale Denaturierung:	95°C	3-15 min
	2. Denaturierung:	94°C	1 min
	3. Annealing:	50°-60°C	30 sec-1 min
	4. Elongation:	72°C	x min
	5. Finale Elongation	72°C	5-10 min
	6. Pause	12°C	

Die Temperatur für das Annealing, ergab sich aus der Sequenz der verwendeten Primer und wurde näherungsweise über folgende Formel berechnet:

$$T_m = [(G + C) \times 4] + [(A + T) \times 2] \text{ (in } ^\circ\text{C)}$$

T_m = Schmelztemperatur, A = Adenin, T = Thymin, G = Guanin, C = Cytosin

Die Zeit für die Elongationsphase wurde in Abhängigkeit von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Segments gewählt. Als Richtwert wurden ca. 1000 bp pro min angenommen. Die PCR-Produkte wurden zur Analyse, mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt bzw. bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.2.8 Aufkoch-PCR

Die Aufkoch-PCR diente zur Kontrolle auf positive bakterielle Kolonien. Zunächst wurde ein Bakterienlysat, der zu untersuchenden Kolonie hergestellt. Die Bakterien wurden in je 50 µl H₂O_{dd} mit Hilfe eines Holzzahnstochers in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß resuspendiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension bei 100°C für 4 min aufgekocht. Die aufgekochten Bakterien wurden bei 10000 rpm für 4 min abzentrifugiert. Vom Überstand wurden 5 µl als Template in der PCR eingesetzt. Für die Aufkoch-PCR wurde ein 50 µl Ansatz mit der Taq DNA Polymerase (Invitek) angesetzt.

Reaktionsansatz:	Taq DNA Polymerase	0,3 µl
	10x NH ₄ Reaction Puffer	5,0 µl
	50 mM MgCl ₂ Solution	1,5 µl
	10 mM dNTP Mix	0,5 µl
	Primer-U	0,3 µl
	Primer-R	0,3 µl
	Template DNA	5,0 µl
	ad 50 µl H ₂ O _{dd}	

Die PCR-Reaktion wurde wie unter 2.2.2.7 beschrieben durchgeführt. Im Anschluss wurden die PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

2.2.2.9 Inverse-PCR

Die Inverse-PCR wurde zum Deletieren eines Gens eingesetzt, das zuvor in ein Plasmid kloniert wurde. Für die PCR-Reaktion wurde eine DNA Polymerase mit einer Korrekturlesefunktion (proofreading) verwendet. Die Primer wurden so gewählt, dass das gewünschte Gen deletiert und gleichzeitig mittels einer Punktmutation eine *XbaI* (TCTAGA) Restriktionsschnittstelle eingebaut wurde. Anschließend wurde das DNA-Produkt der Inversen-PCR durch Religation in ein rekombinantes Plasmid überführt.

Reaktionsansatz:	KAPAHiFi DNA Polymerase (1 U/μl)	1 μl	
	5x KAPAHiFi Reaction Buffer	10 μl	
	10 mM KAPA dNTP Mix	1,5 μl	
	Primer-U	1,0 μl	
	Primer-R	1,0 μl	
	Plasmid DNA	x μg	
	ad 50 μl H ₂ O _{dd}		
PCR-Reaktion:	1. Initiale Denaturierung:	95°C	2 min
	2. Denaturierung:	98°C	20 sec
	3. Annealing:	45°-60°C	30 sec
	4. Elongation:	68°C	x min
	5. Finale Elongation:	68°C	5 min
	6. Pause:	12°C	

Die Schritte 2 bis 4 wurden in 35 Zyklen wiederholt.

2.2.2.10 Sequenzierungs-PCR

Die Sequenzierung von DNA wurde mit dem „ABI BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit“ (Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt.

Für die PCR-Reaktion wurden folgende DNA-Mengen eingesetzt:

PCR-Produkte (100-200 bp)	1-3 ng
PCR-Produkte (200-500 bp)	3-10 ng
PCR-Produkte (500-1000 bp)	10-20 ng

Reaktionsansatz:	DNA	x µl
	Primer (10 pmol/µl)	0,5 µl
	BigDye 3.1	1,0 µl
	5x Puffer	1,5 µl
	ad 10 µl H ₂ O _{dd}	

PCR-Reaktion:	1. Initiale Denaturierung:	96°C	2 min
	2. Denaturierung:	96°C	10 sec
	3. Annealing:	45°-60°C	10 sec
	4. Elongation:	60°C	4 min
	5. Pause	4°C	

Die Schritte 2 bis 4 wurden in 25 Zyklen wiederholt.

Die DNA-Proben wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert. Die Aufreinigung der Proben mittels Gelfiltration und die anschließende Sequenzierung wurden durch das Sequenzierungslabor der Organisationseinheit ZBS1 am Robert Koch-Institut durchgeführt. Für die Auswertung der DNA Sequenzen wurde das Programm „BioEdit sequence alignment editor and analysis“, Version 7.0.9.0 verwendet.

2.2.2.11 cDNA Synthese

Das Umschreiben von RNA in cDNA erfolgte mit dem “SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit” (Invitrogen). Die aus den Bakterien isolierte RNA wurde zuvor auf die gewünschte Konzentration mit H₂O_{dd} (DEPC) eingestellt. Die Reaktion wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde vorsichtig gemischt und zunächst bei 25°C für 10 min inkubiert. Die eigentliche Synthese der cDNA erfolgte durch die SuperScript III Reverse Transkriptase bei 42°C für 2 h. Zum Beenden der Reaktion wurde der Ansatz hitzeinaktiviert (85°C, 5 min). Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Reaktionsansatz:	5x VILO Reaction Mix	4 µl
	10x SuperScript Enzym Mix	2 µl
	RNA (max. 2,5 µg)	x µl
	ad 20 µl H ₂ O _{dd} (DEPC)	

2.2.2.12 Real-time PCR (qPCR)

Für die Real-time PCR wurde das „EXPRESS SYBR GreenER qPCR Supermix Universal Kit“ (Invitrogen) verwendet. Als Template diente chromosomale DNA oder cDNA. Die Oligonukleotide wurden so gewählt, dass PCR-Produkte von 80 bis 250 bp amplifiziert wurden. Zur Detektion der amplifizierten doppelsträngigen DNA wurde der Fluoreszenzfarbstoff „Sybr Green“ verwendet. Die Fluoreszenz-Messung erfolgte durch das Gerät Mx3000P (Stratagene). Ebenso wurde die Anzahl der „Genkopien“ in Abhängigkeit einer Standardkurve durch die MxPro Software (Stratagene) berechnet. Für die Standardkurve wurden aus jeder Probe 10 µl entnommen und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gemischt. Dieses DNA-Gemisch (10^7) diente zur Herstellung einer Verdünnungsreihe von 10^7 bis 10^1 . Hierzu wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß jeweils 90 µl H₂O_{dd} (DEPC) vorgelegt und anschließend jeweils 10 µl vom DNA-Gemisch zugegeben. Jede Probe wurde dreimal pipettiert.

Reaktionsansatz:	Express Sybr GreenER qPCR SuperMix Universal	10 µl
	10 µM Primer-U (200 mM Endkonzentration)	0,4 µl
	10 µM Primer-R (200 mM Endkonzentration)	0,4 µl
	ROX Reference Dye (25 µM)	0,04 µl
	DNA oder cDNA	x µl
	ad 20 µl H ₂ O _{dd} (DEPC)	

PCR-Reaktion:	Segment 1: (1x)	Denaturierung:	95°C	10 min
	Segment 2: (40x)	Denaturierung:	95°C	30 sec
		Annealing:	55°C	30 sec
		Elongation:	72°C	30 sec
	Segment 3 (1x)	Denaturierung:	95°C	1 min
		Annealing:	55°C	30 sec
		Denaturierung	95°C	30 sec

2.2.2.13 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese

Die horizontale Agarose-Gelelektrophorese diente zur Auftrennung von DNA-Fragmenten aus PCR und Restriktionsverdau. Es wurde ein 0,9 %-iges Agarosegel verwendet. Hierfür wurde die Agarose in TAE aufgekocht und anschließend auf eine Trägerplatte gegossen. Vor dem Gießvorgang wurde auf der Trägerplatte ein entsprechender Kunststoffkamm angebracht. Dadurch wurden im Agarosegel Taschen erzeugt, die zum Auftragen der Proben dienten. Die DNA-Proben wurden mit 10x Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Elektrophoresepuffer wurde 1x TAE verwendet. Die Gelelektrophorese wurde in einer Flachgelapparatur (Biorad) durchgeführt, die an eine Stromquelle angeschlossen wurde. Dabei wanderten die DNA-Fragmente in Richtung der Anode und wurden entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Zur Bestimmung der Größe der DNA-Fragmente diente eine „1 kb DNA Ladder“ (Fermentas) als Standard. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 V für ca. 60 min. Für die Visualisierung der DNA wurde das Agarosegel für 15 bis 20 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (50µg/ml) angefärbt. Die Auswertung erfolgte mittels UV-Licht.

Agarosegel (0,9%)

Agarose	4,5 g
1x TAE	500 ml

50x TAE (Tris-Acetat-EDTA), pH 8,0

Tris	242,0 g
Eisessig	57,1 ml
0,5 M EDTA	100 ml
ad 1 l H ₂ O _{dd}	

10x Ladepuffer

Bromphenolblau	0,107 g
Xylencyanol	0,125 g
Ficoll Typ 400	0,78 g
ad 50 ml H ₂ O _{dd}	

2.2.2.14 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel

Für die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel wurde das „Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System“ von Promega verwendet. Die DNA-Fragmente der gewünschten Größe wurden unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 10 µl „Membrane Binding Solution“ pro 10 µg Gelstück hinzugefügt. Das Gemisch wurde bei 60°C so lange inkubiert, bis sich das Gel vollständig aufgelöst hatte. Zum Binden der DNA diente ein spezielles SV-Minisäulchen. Dabei wurde das Gemisch aus gelöstem Agarosegel und „Membrane Binding Solution“ auf das Säulchen aufgetragen und bei Raumtemperatur für 1 min inkubiert. Anschließend wurde das Säulchen bei 16000 x g für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und das Säulchen wurde mit 700 µl „Membrane Wash Solution“ gewaschen (16000 x g, 1 min). Der Durchfluss wurde erneut verworfen und es folgte ein zweiter Waschschriff mit 500 µl „Membrane Wash Solution“ (16000 x g, 1 min). Zum Trocknen wurde das Säulchen bei 16000 x g für 5 min zentrifugiert. Um die DNA zu eluieren, wurde das Säulchen auf einem sauberen 1,5 ml Reaktionsgefäß platziert, mit 50 µl H₂O_{dd} beladen und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Das Eluieren der DNA erfolgte bei 16000 x g für 1 min. Die Probe wurde bei -20°C gelagert.

2.2.2.15 DNA-Fällung

Die DNA-Probe wurde mit 1/10 Volumen 3 M NaAc (pH 4,8) und 3 Volumen eiskaltem 100 %-igem EtOH versetzt. Die DNA-Fällung erfolgte bei -20°C für mind. 1 h. Anschließend wurde die Probe bei 14000 rpm für 10 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das trockene Pellet wurde in 10 bis 20 µl H₂O_{dd} resuspendiert. Die DNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.2.16 Aufreinigung von DNA aus PCR und Restriktionssverdau

Das „MSB Spin PCRapace Kit“ von Invitex wurde verwendet um DNA-Fragmente aus enzymatischen Reaktionen, wie PCR und Restriktionsverdau, aufzureinigen. Es wurden 50 µl PCR- bzw. Restriktionsansatz mit 250 µl „Binding“ Puffer durch vortexen gemischt. Zum Binden der DNA-Fragmente wurde ein Säulchen mit dem Gemisch beladen und bei 12000 rpm für 3 min zentrifugiert. Um Rückstände von Ethanol zu entfernen wurde die Probe ein weiteres Mal zentrifugiert (12000 rpm, 2 min). Zum Eluieren der DNA wurde das Säulchen

auf ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß platziert und mit 25 µl H₂O_{dd} beladen. Die Probe wurde bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert und anschließend bei 10000 rpm für 1 min zentrifugiert. Die DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.2.17 DNA-Restriktion

Der Verdau von doppelsträngiger DNA erfolgte durch Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs). Für die Restriktion von Plasmid DNA wurde der Reaktionsansatz 4 bis 6 h bei 37°C im Heizblock inkubiert. Anschließend wurden die Enzyme bei 65°C für 15 min inaktiviert.

Reaktionsansatz:	DNA	x µg
	10x NEB Puffer	5 µl
	Enzym	1 µl
	ad 50 µl H ₂ O _{dd}	

2.2.2.18 Ligation eines Inserts in einen Vektor

Für die direkte Klonierung von PCR-Produkten wurde das „pGEM-T Easy Vector System“ von Promega benutzt. Durch die Taq DNA Polymerase wurde während der PCR-Reaktion ein unspezifischer 3'-dA-Überhang angefügt. Dieser Überhang wurde für die Klonierung der DNA-Fragmente in den pGEM-T Easy Vektor genutzt. Der Vektor selbst enthielt in der „Multiple Cloning Site“ (MCS) einen dT-Überhang. Die Ligation erfolgte durch eine T4 DNA Ligase. Es wurde ein Reaktionsvolumen von 20 µl verwendet. Die Ligation erfolgte bei 4°C für 24 h im Kühlschrank.

Reaktionsansatz:	2x Rapid Ligation Puffer	10 µl
	pGEM-T Easy Vektor	1 µg
	DNA-Insert	3 µg
	T4 DNA Ligase	2 µl
	ad 20 µl H ₂ O _{dd}	

Die Ligation von DNA-Restriktionsfragmenten in einen Vektor erfolgte ebenfalls mittels einer T4 DNA Ligase (New England Biolabs). Durch die Restriktion mit den gleichen Endonukleasen wurden zuvor beim DNA-Insert und Vektor einzelsträngige Überhänge (sticky ends) erzeugt. Das Reaktionsvolumen betrug 40 µl. Die Ligation erfolgte bei 4°C für 24 h im Kühlschrank.

Reaktionsansatz:	10x T4 DNA Ligase Puffer	4 µl
	Vektor	1 µg
	DNA-Insert	3 µg
	T4 DNA Ligase	2 µl
	ad 40 µl H ₂ O _{dd}	

Die Ligation von DNA-Fragmenten in einen Vektor erfolgte alternativ auch mit dem „Rapid DNA Ligation Kit“ (Fermentas). Es wurde ein Reaktionsvolumen von 40 µl eingesetzt. Die Ligation erfolgte bei Raumtemperatur für 1 h.

Reaktionsansatz:	5x Rapid Ligation Puffer	8 µl
	Vektor	1 µg
	DNA-Insert	3 µg
	T4 DNA Ligase	2 µl
	ad 40 µl H ₂ O _{dd}	

Für eine Ligation wurden Vektor und Insert stets in einem Verhältnis von 1:3 eingesetzt. Anschließend wurde das Enzym bei 65°C für 20 min inaktiviert. Die Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

2.2.2.19 Religation

Die Religation diente zur Erzeugung von rekombinanten Plasmiden, die zuvor über eine Inverse-PCR amplifiziert wurden. Dabei wurden doppelsträngige DNA-Fragmente mit stumpfen Enden verwendet. Die Religation erfolgte mittels T4 DNA Ligase (New England Biolabs). Für die Reaktion wurden die Proben bei 4°C für ca. 24 h inkubiert. Anschließend wurde die Ligase bei 65°C für 20 min inaktiviert.

Reaktionsansatz:	DNA	x µg
	10x T4 DNA Ligase Puffer	10 µl
	T4 DNA Ligase	5 µl
	ad 100 µl H ₂ O _{dd}	

2.2.2.20 Generierung einer Deletionsmutante bei *L. pneumophila*

Die Generierung einer Deletionsmutante bei *L. pneumophila* Corby erfolgte in mehreren Schritten. Zunächst wurde das Gen, das deletiert werden sollte und die flankierenden Sequenzen (ca. 1000 bp), mit einem spezifischen Primerpaar Primer-U und Primer-R amplifiziert. Für diese PCR wurde eine Taq DNA Polymerase verwendet, die PCR-Produkte mit 3'-dA-Überhängen generiert. Als Template diente chromosomale DNA. Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt, in den Vektor pGEM-T Easy (Promega) ligiert und anschließend durch Elektroporation in *E. coli* DH5α transformiert. Das aus den Bakterien isolierte rekombinante Plasmid diente als Template für eine Inverse-PCR. Für die Inverse-PCR wurden das Primerpaar Primer-MU und Primer-MRxba so gewählt, dass durch die PCR das gewünschte Gen deletiert wurde und gleichzeitig durch einen der Primerpaare in der Sequenz, mittels Punktmutation eine *Xba*I Restriktionsschnittstelle (TCTAGA) eingebaut wurde. Für diese PCR-Reaktion wurde eine DNA Polymerase verwendet, die PCR-Produkte mit glatten Enden generiert. Durch Religation wurde das PCR-Produkt in ein rekombinantes Plasmid überführt. Das Plasmid wurde in *E. coli* DH5α elektroporiert. Das aus den Bakterien isolierte Plasmid wurde mit der Restriktionsendonuklease *Xba*I linearisiert und die Km^R-Kassette wurde ebenfalls mit *Xba*I geschnitten. Anschließend wurden beide Elemente zu einem neuen rekombinanten Plasmid ligiert und in *E. coli* DH5α vermehrt. Das Plasmid diente in der PCR als Template, um das Endkonstrukt, bestehend aus der Antibiotikaresistenzkassette und den flankierenden genomischen Sequenzen, zu amplifizieren (Primer-U und Primer-R). Für die Generierung der Deletionsmutanten wurden folgende Plasmide bzw. Endkonstrukte verwendet: pML16 für $\Delta pilT$, pML19 für $\Delta lpc1884$, pML25a für $\Delta lpc1833$, pML28 für $\Delta lpc2123$ und pML58 für $\Delta lvrR$. Zum Einbau einer Km^R-Kassette innerhalb von *LpcGI-2*, zwischen die Gene *lpc1856* und *lpc1857* diente pML22b. Das PCR-Konstrukt wurde durch natürliche Transformation in *Lp* Corby transformiert. Über den Mechanismus der homologen Rekombination wurde das gewünschte Gen, durch den Einbau der Antibiotikaresistenzkassette deletiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf BCYE Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum.

2.2.3 Transformation von Bakterien

2.2.3.1 Herstellung von elektrokompetenten *E. coli*

Für die Herstellung von elektrokompetenten Bakterien wurden 50 ml LB-Flüssigmedium mit 1 ml *E. coli* Übernachtskultur angeimpft. Die Bakterien wurden bei 37°C im Schüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 bis 1,0 kultiviert. Anschließend wurde die Kultur in ein 50 ml Röhrchen überführt und bei 4°C bei 4000 rpm für 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde restlos abgenommen und das Pellet wurde dreimal mit je 50 ml eiskaltem 10 %-igem Glycerin gewaschen. Alle Waschschrte erfolgten auf Eis und die Bakterien wurden jeweils bei 4°C bei 4000 rpm für 10 min pelletiert. Im Anschluss wurden die Bakterien in 500 µl eiskaltem 10 %-igem Glycerin resuspendiert und in 80 µl Aliquots in sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die elektrokompetenten *E. coli* Bakterien wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.3.2 Herstellung von elektrokompetenten *L. pneumophila*

Die Herstellung von elektrokompetenten *L. pneumophila* Bakterien erfolgte ähnlich wie bei *E. coli*. Die Legionellen wurden auf BCYE Agarplatten bei 37°C für 2 Tage kultiviert. Anschließend wurden die Bakterien mit 5 ml eiskaltem 10 %-igem Glycerin abgeschwemmt, in ein 50 ml Röhrchen überführt und mit der Glycerinlösung auf 50 ml aufgefüllt. Die Bakterien wurden bei 4°C bei 4000 rpm für 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde zweimal mit je 50 ml eiskaltem 10 %-igem Glycerin gewaschen (4°C, 4000 rpm, 10 min). Nach dem letzten Waschschrte wurde das Pellet in 500 µl eiskaltem 10 %-igem Glycerin resuspendiert. Aliquots von je 80 µl wurden in sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.3.3 Transformation durch Elektroporation

Die Transformation von Plasmid DNA in Bakterien erfolgte mittels Elektroporation. Ein 80 µl Aliquot der elektrokompetenten Bakterien wurde mit 1-5 µl Plasmid DNA versetzt und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien in eine gekühlte Elektroporationsküvette überführt und elektroporiert. Die Elektroporation von *E. coli* erfolgte bei 1,7 kV, 100Ω und 25 µF. Die Legionellen wurden bei 2,7 kV, 100Ω und 25 µF

transformiert. Nach dem Elektroporieren wurden die Bakterien sofort in vorgewärmtes Flüssigmedium überführt und bei 37°C für 1 h (*E. coli*) bzw. 6 h (*Legionella*) inkubiert. Danach wurden die Bakterien auf den entsprechenden Agarplatten ausplattiert und bei 37°C kultiviert. Zur Selektion der positiven Kolonien dienten Agarplatten mit entsprechendem Zusatz an Antibiotika.

2.2.3.4 Natürliche Transformation von *L. pneumophila* Corby

Der Mechanismus der natürlichen Transformation wurde bei *L. pneumophila* Corby zur Generierung der Deletionsmutanten eingesetzt. Die Bakterien wurden zunächst in 3 ml YEB-Medium bei 30°C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀~1,0 kultiviert. Anschließend wurden 2 ml der Flüssigkultur in ein steriles Greinerröhrchen überführt und die aufgereinigte DNA aus 10 x 50 µl PCR-Reaktionsansätzen wurde hinzu pipettiert. Für die natürliche Transformation wurden die Bakterien bei 30°C für 3 Tage im Brutschrank inkubiert. Die Transformanten wurden auf Km-BCYE-Agarplatten ausplattiert und bei 37°C für 3 bis 4 Tage kultiviert.

2.2.3.5 Konjugation

Die Transformation der genomischen Inseln von *L. pneumophila* Corby in andere *Legionella* Stämme erfolgte mittels Konjugation. Als Donor wurde *L. pneumophila* Corby verwendet und als Rezipient fungierten *L. pneumophila* Philadelphia I JR32 bzw. *L. oakridgensis* ATCC 33761. Der Rezipient wurde in 30 ml YEB Medium, bis zum Erreichen der stationären Phase (OD₆₀₀~2,0) bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Der Donor wurde „rollend“ in 10 ml YEB Medium bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀~1,0 kultiviert. Vom Donor wurde 1 ml und vom Rezipienten wurden 2 ml, jeweils in ein 1,5 bzw. 2 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 4000 rpm für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt. Zunächst wurde das Pellet des Rezipienten in 500 µl H₂O_{dd} resuspendiert und anschließend wurde das Bakteriengemisch auf das Pellet des Donors gegeben. Donor und Rezipient wurden durch vorsichtiges auf- und abpipettieren gemischt und auf eine BCYE Agarplatte getropft. Die Konjugation wurde jeweils mit und ohne DNase I (1 µg/µl), bei 30°C für 24 h durchgeführt. Am nächsten Tag wurden die Bakterien mit 1 ml H₂O_{dd} von der Agarplatte abgeschwemmt und in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Bakterien wurden in H₂O_{dd} 1:10 bis 1:1000 verdünnt und zur Selektion der Transkonjuganten auf BCYE-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Zur Bestimmung der Zellzahl des Donors, wurden die

Stämme jeweils in einer Verdünnung von 10^{-4} bis 10^{-6} auf BCYE Agarplatten mit Kanamycin ausplattiert. Die Bakterien wurden bei 37°C für 4 Tage im Brutschrank kultiviert. Die Berechnung der Transkonjugationsrate erfolgte nach der Formel: Anzahl Transkonjuganten/Anzahl Donor.

2.2.4 *In vivo* Experimente

2.2.4.1 Coinfektion (72 h) von *A. castellanii* mit *L. pneumophila*

Aus einer einwöchigen *Acanthamoeba* Kultur wurden 1 ml entnommen und in eine neue Kulturflasche mit 9 ml frischen PYG Medium überführt. Die Kultur wurde bei Raumtemperatur für 3 Tage kultiviert. Anschließend wurden die Amöben durch Klopfen abgelöst, in ein 50 ml Falconröhrchen überführt und mit Infektionspuffer auf 40 ml aufgefüllt. Von der Amöbensuspension wurden 100 µl entnommen und in einem Hämacytometer ausgezählt. Das 50 ml Röhrchen wurde bei 800 rpm für 10 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Amöben wurden in Infektionspuffer so resuspendiert, dass sie in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml vorlagen. In eine 24-Well Platte wurden pro Stamm und pro Zeitpunkt (2 h, 24 h, 48 h, 72 h) zwei Wells mit je 1 ml Amöbensuspension gefüllt. Zum Adhäreren der Amöben wurde die Platte bei 37°C, mit 5 % CO₂ für min. 2 h inkubiert. Die Legionellen wurden auf BCYE-Agarplatten bei 37°C für 3 Tage kultiviert. Für die Infektion wurden die Bakterien in Infektionspuffer auf eine OD₆₀₀=1 (ca. 1×10^9 Zellen/ml) eingestellt und bis 10^{-4} verdünnt. Der Puffer wurde von den Amöben abgezogen und auf die adhärerten Zellen wurde je 1 ml Bakteriensuspension gegeben. Die Infektion erfolgte bei 37°C, mit 5 % CO₂, für 2 h. Um den 0 h-Wert zu erhalten, wurden die Bakterien in einer Verdünnung von 10^{-5} auf BCYE-Agarplatten ausplattiert. Nach 2 h Infektion wurde die Bakteriensuspension vorsichtig abgenommen und pro Well wurden je 1 ml Infektionspuffer zugegeben. Der 2 h-Wert wurde abgenommen und auf BCYE-Agarplatten ausplattiert. Die Coinfektion wurde weiter bei 37°C, mit 5 % CO₂ inkubiert und nach jedem Zeitpunkt (24 h, 48 h, 72 h) auf BCYE-Agarplatten ausplattiert. Abhängig von der Dichte der Bakterien wurden von den späteren Zeitpunkten unterschiedliche Verdünnungen ausplattiert. Die Agarplatten wurden bei 37°C für 3 Tage im Brutschrank inkubiert.

Infektionspuffer

NaCitrat	1 g
0,4 M MgSO ₄ x 7H ₂ O	10 ml
0,25 M Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O	10 ml
0,25 M KH ₂ PO ₄	10 ml
0,05 M CaCl ₂ x 2H ₂ O	8 ml
ad 990 ml H ₂ O _{dd}	
Lösung autoklavieren, dann Zugabe von	
0,005 M Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ x 2H ₂ O	10 ml

2.2.4.2 Coinfektion (21 d) von *A. castellanii* mit *L. pneumophila*

Für den Replikationsversuch wurde eine einwöchige *Acanthamoeba* Kultur 1:10 in PYG-Medium verdünnt und bei Raumtemperatur kultiviert. Nach drei Tagen wurden die Amöben durch Klopfen von Boden der Flasche gelöst, in ein 50 ml Falconröhrchen überführt und mit Infektionspuffer auf ein Volumen von 40 ml aufgefüllt. Die Zellzahl wurde mit Hilfe eines Hämacytometers bestimmt. Die Amöben wurden bei 800 rpm für 10 min pelettiert, der Überstand wurde abgenommen und die Amöben wurden mit Infektionspuffer auf eine Konzentration von 10⁵ Zellen pro ml verdünnt. Anschließend wurden in eine 24-Well Platte pro Stamm je 1 ml Amöbensuspension gegeben. Zum Adhärieren der Zellen, wurde die Platte bei 37°C, mit 5 % CO₂ für 2 h inkubiert. Die Bakterien wurden auf BCYE Agarplatten bei 37°C für 3 Tage kultiviert. Die *Legionella* Stämme wurden mit Infektionspuffer auf eine OD₆₀₀=1 (ca. 1 x 10⁹ Zellen/ml) eingestellt und dann bis 10⁻⁶ (MOI=0,01) im gleichen Puffer verdünnt. Von den adhärirten Amöben wurde der Infektionspuffer abgenommen und durch 1 ml der Bakteriensuspension ersetzt. Um den 0 h Wert zu erhalten, wurden die Bakterien in einer Verdünnung von 10⁻⁵ auf BCYE- und Km-BCYE-Agarplatten ausplattiert. Für die Replikation wurde die 24-Well Platte bei 37°C, mit 5 % CO₂ inkubiert. Nach 3 Tagen wurden 100 µl aus der Infektion entnommen und in Infektionspuffer bis 10⁻³ verdünnt. Zur Bestimmung der Zellzahl, wurden die Bakterien auf BCYE- und Km-BCYE-Agarplatten ausplattiert (37°C, 4 Tage). Die 24-Well Platte mit der Infektion wurde bei 37°C, mit 5% CO₂ für weitere 4 Tage inkubiert. Am Tag 7 wurde eine neue 24-Well Platte mit einer frischen Amöbenkultur vorbereitet (s. o.). Die einzelnen Wells der eine Woche alten Infektion wurden mit Infektionsmedium bis 10⁻³ verdünnt. Anschließend wurde je 1 ml des Bakteriengemisches zu den frischen Amöben gegeben und die Platte wurde bei 37°C, mit 5 % CO₂ inkubiert. Für

Tag 10 und die dritte und vierte Woche, wurde das Experiment wie in der ersten bzw. zweiten Woche durchgeführt.

2.2.4.3 *L. pneumophila* „Competition“ in *A. castellanii*

Eine einwöchige *Acanthamoeba* Kultur wurde 1:10 in PYG-Medium verdünnt und bei Raumtemperatur für drei Tage in einer Zellkulturflasche kultiviert. Die Amöben wurden durch Klopfen von Boden der Flasche gelöst, in ein 50 ml Falconröhrchen überführt und mit Infektionspuffer auf ein Volumen von 40 ml aufgefüllt. Die Zellzahl wurde mit Hilfe eines Hämacytometers bestimmt. Die Amöben wurden bei 800 rpm für 10 min pelettiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Amöben wurden mit Infektionspuffer auf eine Konzentration von 10^5 Zellen pro ml verdünnt. In eine 24-Well Platte wurden pro Stamm je 1 ml Amöbensuspension gegeben. Zum Adhärenieren der Zellen, wurde die Platte bei 37°C, mit 5 % CO₂ für 2 h inkubiert. Die Bakterien wurden auf BCYE-Agarplatten bei 37°C für 3 Tage kultiviert. Mit Infektionspuffer wurden die *Legionella* Stämme auf eine OD₆₀₀=1 eingestellt, was einer Zellzahl von ca. 1×10^9 entsprach. Der *Legionella* Wildtypstamm und eine Mutante wurden 1:1 gemischt und dann bis 10^{-6} (MOI=0,01) in Infektionspuffer verdünnt. Der Infektionspuffer wurde von den Amöben abgezogen und durch 1 ml der Bakteriensuspension ersetzt. Um den 0 h Wert zu erhalten, wurden die Bakterien in einer Verdünnung von 10^{-5} auf BCYE- und Km-BCYE-Agarplatten ausplattiert. Für die „Competition“ wurde die 24-Well Platte bei 37°C, mit 5 % CO₂ inkubiert. Nach 3 Tagen wurden 100 µl aus der „Competition“ entnommen und in Infektionspuffer bis 10^{-3} verdünnt. Zur Bestimmung der Zellzahl, wurden die Bakterien auf BCYE- und Km-BCYE-Agarplatten ausplattiert (37°C, 4 Tage). Die 24-Well Platte mit der Competition wurde im Brutschrank für weitere 4 Tage inkubiert. Am Tag 7 wurde eine neue 24-Well Platte mit einer frischen Amöbenkultur vorbereitet (s. o.). Die einzelnen Wells der Competition (erste Woche) wurden mit Infektionsmedium bis 10^{-3} verdünnt. Anschließend wurde je 1 ml des Bakteriengemisches zu den frischen Amöben gegeben und die Platte wurde bei 37°C, mit 5 % CO₂ inkubiert. Für Tag 10 und die dritte und vierte Woche, wurde die Competition wie in der ersten bzw. zweiten Woche durchgeführt. Die Inkubation auf den Agarplatten ohne Antibiotikum lieferte die Anzahl der Kolonien von Mutante und Wildtyp. Durch die Inkubation auf BCYE-Agarplatten mit Kanamycin konnten die CFU-Werte der Mutante bestimmt werden. Die CFU-Werte des „Wildtyps“ ergaben sich aus der Subtraktion der CFU-Werte der BCYE Agarplatten mit Kanamycin, von den CFU-Werten der BCYE Agarplatten ohne Kanamycin.

2.2.4.4 Coinfektion von *A. castellanii* mit *L. pneumophila* zur Isolierung chromosomaler DNA

Für die Infektion wurde aus einer drei Tage alten *Acanthamoeba* Vorkultur eine Hauptkultur angesetzt. Die Amöben wurden in einem Verhältnis von 1:10 in einem 50 ml Gesamtvolumen in drei großen Zellkulturflaschen überführt. Als Nährmedium diente PYG. Die Amöben wurden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei Tagen wurde das Wachstumsmedium vollständig entfernt und die Zellen wurden zweimal mit je 10 ml Infektionspuffer gewaschen. Für die Adhäsion der Zellen wurden die Amöben mit 50 ml Infektionspuffer bedeckt und bei 37°C, mit 5 % CO₂ für 2 h inkubiert. Die Zellzahl entsprach ca. 2×10^5 Zellen/ml und 10^7 Zellen/Flasche. Die *Legionella* Stämme wurden auf BCEY Agarplatten bei 37°C für 3 Tage im Brutschrank inkubiert. Für die Infektion wurden die Bakterien in Infektionspuffer resuspendiert und auf eine OD₆₀₀=1 eingestellt. Anschließend wurde in jede Amöben-Flasche 1 ml *Lp*-Suspension gegeben. Dies entsprach einer MOI=100 bzw. 10^9 Bakterien/ml. Die Infektion erfolgte bei 37°C, mit 5 % CO₂. Nach exakt 2 h wurde die Suspension vollständig entfernt, die Zellen wurden zweimal mit je 10 ml Infektionspuffer gewaschen und dann mit 50 ml Puffer bedeckt. Die weitere Replikation der Legionellen in den Amöben erfolgte bei 37°C, mit 5 % CO₂ für 20 h. Am nächsten Tag wurden die inzwischen abgekugelten Amöben in 50 ml Falconröhrchen überführt. Zum Lysieren wurden die Amöben bei -80°C für 2 h eingefroren und danach im 37°C Wasserbad aufgetaut. Zunächst wurde die *Legionella*-*Acanthamoeba* Suspension bei 4°C, für 15 min bei 600 g zentrifugiert. Dadurch wurden überwiegend die lysierten Amöben pelettiert. Der Überstand wurde in neue 50 ml Falconröhrchen überführt und bei 4°C, für 15 min bei 3360 g abzentrifugiert. Das Pelett wurde anschließend dreimal mit H₂O_{dd} gewaschen (4°C, 15 min, 3360 g) und in 200 µl H₂O_{dd} resuspendiert. Die chromosomale DNA wurde aus den bakteriellen Zellen mit dem „Generation™ Capture Column Kit“ isoliert (siehe Methoden, 2.2.2.1).

2.2.4.5 Coinfektion von U-937 Zellen mit *Legionella*

Die Kultivierung von U-937 Zellen erfolgte in RPMI mit 10 % FCS bei 37°C und 5 % CO₂. Für die Coinfektion wurden zunächst die U-937 Zellen in Makrophagen transformiert. Hierfür wurden die Zellen (je 25 ml) aus einer großen bewachsenen Flasche auf drei große Flaschen geteilt und mit RPMI + 10 % FCS auf 100 ml aufgefüllt. Für die Zelltransformation wurden in jede Flasche 5 µl PMA (Sigma P8139, Stock 1 mg/ml) in einer Konzentration von 1:20000 zugegeben und bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 2 Tagen wurde der Überstand von den

Transformierten Zellen vollständig entfernt und die Zellen wurden einmal kurz mit 10 ml 0,2 % EDTA in 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit je 10 ml RPMI + 10 % FCS abgespült und in einem 50 ml Röhrchen zusammengefasst. Die Zellsuspension wurde im Röhrchen bei Bedarf auf 50 ml mit RPMI + 10 % FCS aufgefüllt und zum Mischen vorsichtig invertiert. Für die Bestimmung der Zellzahl wurden 100 µl Zellsuspension mit 100 µl Trypanblau gemischt und auf ein Hämacytometer gegeben. Währenddessen wurden die Zellen bei 800 rpm für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in RPMI + 10 % FCS so resuspendiert, dass die Zellen in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml vorlagen. In eine 24-Well Platte wurden pro Stamm, für jeden Zeitpunkt (2 h, 24 h, 48 h, 72 h) zwei Wells mit je 1 ml Zellsuspension befüllt. Zur Adhäsion der Zellen, wurde die Platte bei 37 °C, 5 % CO₂ für 2 h inkubiert. Die Bakterien wurden auf BCYE Agarplatten für 2 Tage bei 37°C kultiviert. Für die Coinfektion wurden die Bakterien in PBS auf eine OD₆₀₀ = 1 (ca. 1×10^9 Zellen/ml) eingestellt und anschließend in RPMI bis 10^{-4} verdünnt. Der Überstand wurde von den Zellen abgenommen und durch je 1 ml der verdünnten Bakteriensuspension ersetzt. Die Infektion erfolgte bei 37°C, 5 % CO₂ für exakt 2 h. Um den 0 h Wert zu erhalten, wurde von den Bakterien eine 10^{-5} Verdünnung auf BCYE Agarplatten ausplattiert. Nach 2 h Infektion wurde der Überstand mit den Bakterien abgenommen und die Zellen wurden dreimal mit RPMI gewaschen. Anschließend wurde pro Well je 1 ml RPMI + 10 % FCS zugegeben. Beim 2 h Wert wurden die Zellen mit 10 µl 10 % Saponin (Sigma S4521) für ca. 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Die so behandelten Zellen wurden durch mehrfaches Pipettieren abgelöst, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit Hilfe des „Spiralplaters“ auf BCYE Agarplatten ausplattiert. Die Bakterien wurden bei 37°C für 3 bis 4 Tage kultiviert. Für die späteren Zeitpunkte (24 h, 48 h, 72 h) wurde die 24-Well Platte bei 37°C, mit 5 % CO₂ inkubiert. Die entsprechenden Proben wurden wie der 2 h Wert genommen. In Abhängigkeit der Replikation der Bakterien in den Makrophagen, wurden entsprechende Verdünnungen ausplattiert.

2.2.5 *In Silico* Analyse

Für das „Öffnen“ von sequenzierten Genomen wurde das Programm „Artemis“ (Release 12, 1. Standard, Copyright 1998-2010, The Wellcome Trust Sanger Institute, Pathogen Sequencing Unit) verwendet. Die Genomsequenzen wurden mit Hilfe des Programms Artemis visualisiert und die Sequenz der gewünschten Gens wurde im FASTA-Format als Nukleotid- bzw. Proteinsequenz angezeigt. Die Accession-Nummern der *Legionella* Genome sind in Tabelle 30 (siehe Anhang) aufgelistet. Der Vergleich von Genen auf DNA- bzw. Proteinebene erfolgte über NCBI-BLAST. Die molekularbiologische Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) wurde über folgende Internetadresse, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> aufgerufen. Zum Vergleich von drei und mehr DNA- oder Proteinsequenzen diente ClustalW2. Die Funktion wurde über die Internetseite des European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), <http://www.ebi.ac.uk/> gestartet.

3 Ergebnisse

3.1 Funktion und Regulation von Trb-1 bei *L. pneumophila* Corby

3.1.1 Die Funktion der Integrase bei der Bildung der episomalen Form von Trb-1

Die genomische Insel Trb-1 codiert für ein Konjugations-/Typ IVA Sekretionssystem. Trb-1 umfasst 42.710 bp und ist im Genom von *Lp* Corby innerhalb des Gens *trnP* (*lpc2778*) integriert, welches für die tRNA^{Pro} codiert (Abb. 9A und B). Neben der chromosomalen Form, kann das mobile Element auch in einer episomalen zirkulären Form (Abb. 9B) existieren (Glöckner et al., 2008).

Um die Funktion, der auf Trb-1 codierten Integrase (*lpc2818*, *int-1*) bei der Bildung der episomalen zirkulären Form der genomischen Insel zu untersuchen, wurde eine Deletionsmutante generiert (*lpc2818::Km^R*). Eine erste Integrase Mutante (Δ *int-1*) wurde bereits während einer zuvor angefertigten wissenschaftlichen Arbeit generiert und mittels PCR charakterisiert (Lautner, 2008). Zu Beginn dieser Arbeit wurde die Mutante mittels PCR (35 Zyklen) mit dem Primerpaar Int-Uin und Int-Rin kontrolliert. Die Oligonukleotide wurden so gewählt, dass nur beim wildtypischen Stamm ein PCR-Produkt amplifiziert werden sollte. Trotz der nachweislich eingebauten Km^R-Kassette, wurde auch bei der Integrase Mutante das „wildtypische“ Gen (*int-1*) amplifiziert. Um in weiteren Versuchen falsche Ergebnisse auszuschließen wurde eine neue Integrase Mutante generiert. Für die Herstellung der Mutante wurde das DNA-Konstrukt vom rekombinanten Plasmid pML12 amplifiziert (siehe Material 2.1.4) und in *Lp* Corby transformiert (Lautner, 2008). Die natürliche Transformation erfolgte wie unter 2.2.3.4 (Methoden) beschrieben. Für die Selektion der Transformanten dienten BCYE Agarplatten mit Kanamycin. Die Transformanten wurden über PCR mit Hilfe spezifischer Primer sowohl auf das Vorhandensein der Km^R-Kassette, als auch auf eine vollständige Deletion von *lpc2818* (Int-Uin und Int-Rin) überprüft.

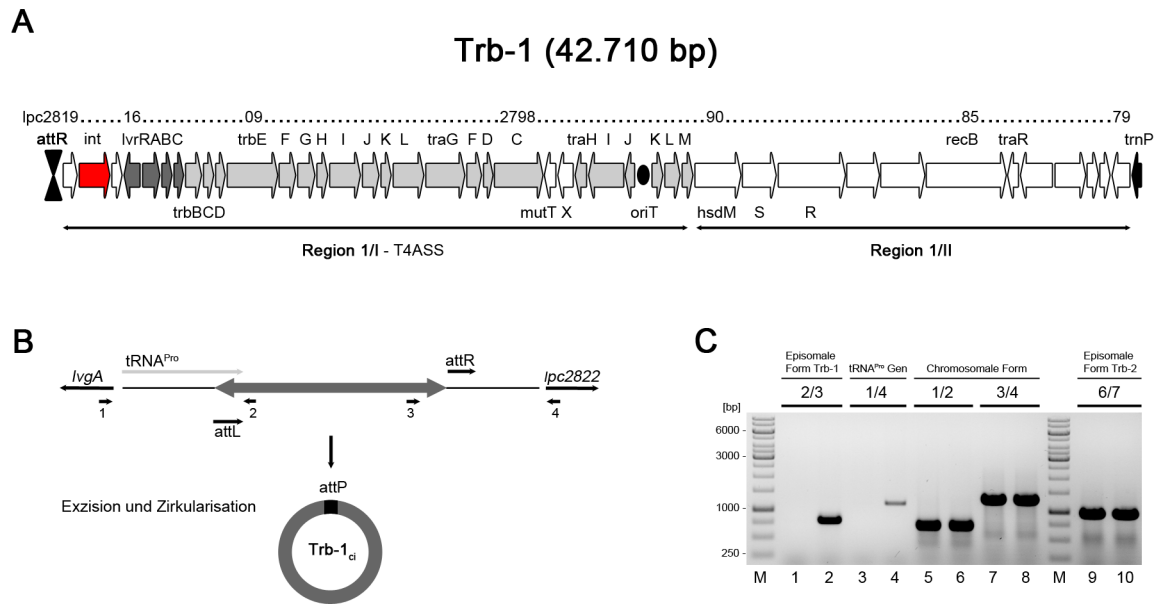


Abb. 9: (A) Organisation der genomischen Insel Trb-1 bei *L. pneumophila* Corby. (B) Mechanismus bei der Bildung der zirkulären episomalen Form von Trb-1. Nach der Exzision bleibt im Genom das intakte tRNA^{Pro} Gen zurück. Die Zahlen 1 bis 4 geben die Orientierung und die Bindungsstellen der Primer 1=trb-1, 2=trb-2, 3=trb-3 und 4=trb-4 an. (C) Charakterisierung der Integrase Mutante *Lp* Corby $\Delta int-1$ erfolgte mittels PCR. Die episomale Form von Trb-1, war mit dem Primerpaar 2/3 nur beim WT (Spur 2), aber nicht bei $\Delta int-1$ (Spur 1) nachweisbar. Auch das Intakte tRNA^{Pro} Gen (*lpc2778*) konnte mit der Primerkombination 1/4 nur beim WT (Spur 4), aber nicht bei der Integrase Mutante (Spur 3) detektiert werden. Die chromosomale Form von Trb-1 war mit den Primerpaaren 1/2 und 3/4 sowohl beim WT (Spur 6 und 8), als auch bei der Mutante (Spur 5 und 7) vorhanden. Die episomale Form der genomischen Insel Trb-2 war mit dem Primerpaar 6/7 (*trb-6/trb-7*) bei $\Delta int-1$ (Spur 9) und beim WT (Spur 10) nachweisbar. Als Template diente chromosomale DNA (100 ng/ μ l). Die PCR-Produkte wurden in 35 Zyklen amplifiziert. (Glöckner et al., 2008; modifiziert [A, B])

Die Charakterisierung von *Lp* Corby $\Delta int-1$ (Klon 13) erfolgte durch PCR (35 Zyklen) und Agarose-Gelelektrophorese. Als Template diente chromosomale DNA (100 ng/ μ l). Zur Kontrolle der zirkulären episomalen Form von Trb-1 wurde das Primerpaar *trb-2/trb-3* verwendet (Abb. 9B). Die PCR lieferte ein Produkt von ca. 750 bp. Im Vergleich zum wildtypischen Stamm *Lp* Corby (Abb. 9C, Spur 2), konnte bei der Integrase Mutante über PCR die episomale Form von Trb-1 nicht nachgewiesen werden (Abb. 9C, Spur 1). Zusätzlich erfolgte auch ein indirekter Nachweis der episomalen Form über die Kombination der Primer *trb-1/trb-4*. In diesem Fall wurde nur bei einer Exzision von Trb-1 das intakte tRNA^{Pro} Gen amplifiziert (Abb. 9B). Bei *Lp* Corby konnte das intakte tRNA Gen detektiert werden (Abb. 9C, Spur 4), da hier die genomische Insel sowohl in der episomalen, als auch in der chromosomalen Form existieren kann. Das amplifizierte DNA-Fragment entsprach der erwarteten Größe von ca. 1200 bp. Interessanterweise wurde bei der zirkulären Form, im Vergleich zum intakten tRNA^{Pro} Gen, deutlich mehr PCR-Produkt amplifiziert (Abb. 9C,

vergl. Spur 2 und 4). Bei $\Delta int-1$ konnte kein intaktes tRNA^{Pro} Gen amplifiziert werden (Abb. 9C, Spur 3). Dies legt die Vermutung nahe, dass bei der Integrase Mutante Trb-1 fast ausschließlich als chromosomale Form vorliegt. Durch die Primerkombinationen trb-1/trb-2 und trb-3/trb-4 wurde, die in das tRNA^{Pro} Gen integrierte chromosomale Form der genomischen Insel detektiert (Abb. 9B). Sowohl $\Delta int-1$ (Abb. 9C, Spur 5 und 7), als auch bei *Lp* Corby (Abb. 9C, Spur 6 und 8) lag die genomische Insel in einer integrierten chromosomalen Form vor. In einer weiteren PCR wurde untersucht, in wie weit der Funktionsverlust der Trb-1 spezifischen Integrase (Int-1), Einfluss auf die Bildung der episomalen Form von Trb-2 hat. Das Primerpaar trb-6/trb-7 diente hier zum Nachweis der zirkulären episomalen Form von Trb-2. Die genomische Insel Trb-2 lag sowohl bei der Integrase Mutante (Abb. 9C, Spur 9), als auch beim „Wildtyp“ *Lp* Corby (Abb. 9C, Spur 10) als episomale Form vor. Auch die Annahme, dass die auf Trb-2 codierte Integrase (Int-2) die Funktion von Int-1 bei $\Delta int-1$ übernehmen könnte, kann Anhand der Ergebnisse ausgeschlossen werden. Der Phänotyp von $\Delta int-1$ konnte hier nicht komplementiert werden. Die Ergebnisse konnten jedoch durch eine zweite unabhängig generierte Mutante bestätigt werden und bei dreimaliger Wiederholung lieferten die PCR-Reaktionen jeweils ein gleiches Ergebnis.

3.1.2 Der Einfluss der Integrase auf die Konjugation von Trb-1

Die genomische Insel Trb-1 codiert für alle essentiellen *trb/tra* Gene, die für eine Konjugation des mobilen Elements benötigt werden und verfügt zudem über eine *oriT*-Region. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Trb-1 in andere *Legionella* Stämme transferiert wird und dort ortsspezifisch in das Genom der Transkonjuganten (TK) integriert werden kann (Glöckner et al., 2008).

In dieser Arbeit sollte eine mögliche Auswirkung des Phänotyps der Integrase Mutante, auf die Konjugation von Trb-1 untersucht werden. Bei der Konjugation diente daher die Deletionsmutante $\Delta int-1$ (Klon 13) als Donor. Zur Kontrolle wurde für die Konjugation auch der Stamm *Lp* Corby WT^o, ebenfalls als Donor verwendet. Bei *Lp* Corby WT^o handelt es sich um einen wildtypischen Stamm, bei dem eine Km^R-Kassette zwischen die Genen *lpc2816* und *lpc2817* kloniert wurde (Lautner, 2008). Als Rezipient diente der Streptomycin resistente Laborstamm *L. pneumophila* Philadelphia-I JR32 Sm^R. Die Konjugation erfolgte auf BCYE Agarplatten mit und ohne DNase I (siehe Methoden, 2.2.3.5). Zur Selektion der

Transkonjuganten (TK) dienten BCYE Agarplatten mit Kanamycin und Streptomycin. Ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Donorstämmen, zeigte sich nach der Berechnung der Transkonjugationsraten. Die Transkonjugationsrate wurde mit folgender Formel ermittelt, die Anzahl der Transkonjuganten wurde durch die Anzahl des Donors geteilt. Für die Integrase Mutante wurde eine durchschnittliche Transkonjugationsrate von $3,854 \times 10^{-6}$ bestimmt. Beim Kontrollstamm *Lp* Corby WT^o lag die durchschnittliche Konjugationsrate bei $2,585 \times 10^{-4}$. Die Konjugation der genomischen Insel Trb-1 war somit bei der Integrase Mutante ca. um das 68-fache niedriger als beim „wildtypischen“ *Lp* Corby Stamm (Abb. 10).

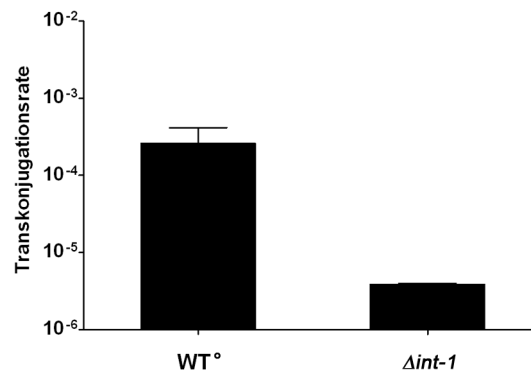


Abb. 10: Graphische Darstellung der Transkonjugationsraten von Trb-1. Als Donor dienten *Lp* Corby WT^o und die Integrase Mutante $\Delta int-1$. Als Rezipient wurde *Lp* Phil-I JR32 verwendet. Die Konjugation erfolgte unter Zugabe von DNase I, bei 30°C auf BCYE Agarplatte. Zur Selektion der Transkonjuganten dienten BCYE Agarplatten mit Kanamycin und Streptomycin. Die Konjugationsrate wurde bestimmt durch: Anzahl Transkonjuganten/Anzahl Donor. Die Konjugationsrate betrug bei *Lp* Corby WT^o $2,585 \times 10^{-4}$ und bei der Integrase Mutante $\Delta int-1$ $3,854 \times 10^{-6}$. Bei den hier angegebenen Werten handelt es sich jeweils um den Mittelwert, aus zwei unabhängigen Experimenten. Der *Lp* Corby Stamm WT^o besitzt innerhalb von Trb-1 eine Km^R-Kassette als Markierung und entspricht phänotypisch dem „Wildtyp“.

Die Charakterisierung der Transkonjuganten erfolgte über PCR und anschließender Agarose-Gelelektrophorese. Alle verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 7 aufgelistet (siehe Material und Methoden). Mit einem spezifischen Primerpaar für das *Lp* Phil-I Gen *lpg0402* (*legA9*) wurde untersucht, in wie weit es sich bei den Transkonjuganten um den ursprünglichen Donor oder Rezipienten handelte. Die jeweils 30 getesteten Transkonjuganten und der Rezipient *Lp* Phil-I JR32 waren für dieses Gen positiv (Tab. 14; siehe Anhang, Abb. 36). Anschließend wurden jeweils 10 Transkonjuganten auf die Trb-1 spezifischen Gene *traG* (*lpc2801*) und *traM* (*lpc2791*) hin untersucht. Beide Gene waren in den Transkonjuganten nachweisbar (Tab. 14; Abb. 36). Mit den Primerkombinationen 1/2 (trb-1/trb-2) und 3/4 (trb-

3/trb-4) konnte gezeigt werden, dass Trb-1 nach der Konjugation in das tRNA^{Pro} Gen (*lpg0524*) der Transkonjuganten integriert werden kann. Die chromosomale Form der genomischen Insel war bei den Transkonjuganten, aus beiden Konjugationsansätzen, mit dem wildtypischen *Lp* Corby Stamm bzw. mit $\Delta int-1$ als Donor, detektierbar (Tab. 14; Abb. 36). Die episomale Form der genomischen Insel (2/3; trb-2/trb-3) konnte ebenfalls sowohl bei den Transkonjuganten mit $\Delta int-1$, als auch mit *Lp* Corby WT^o als Donor nachgewiesen werden (Tab. 14; Abb. 36). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass zwischen der Konjugation bzw. Konjugationsfrequenz und der episomalen bzw. chromosomalen Form von Trb-1, ein Zusammenhang besteht. Existierte Trb-1 fast ausschließlich in der chromosomalen Form, wie dies bei der Integrase Mutante der Fall war, wurde die genomische Insel mit einer deutlich niedrigeren Frequenz in den Stamm *Lp* Phil-I JR32 konjugiert.

Tab. 14: Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Konjugation der genomischen Insel Trb-1 in *L. pneumophila* Phil-I JR32. Die Charakterisierung der Transkonjuganten erfolgte mittels PCR (35 Zyklen) und anschließender Agarose-Gelelektrophorese.

Gen/Primer	Donor		Rezipient	Transkonjuganten	
	<i>Lp</i> Corby WT ^o	$\Delta int-1$	<i>Lp</i> JR32	TK _{WT^o}	TK _{$\Delta int-1$}
<i>lpg0402</i>	-	-	+	+	+
<i>traG</i> (<i>lpc2807</i>)	+	+	-	+	+
<i>traM</i> (<i>lpc2791</i>)	+	+	-	+	+
Episomale Form (2/3)	+	-	-	+	+
tRNA ^{Pro} -Gen (1/4)	+	-	+	+	+
Chromosomale Form (1/2)	+	+	-	+	+
Chromosomale Form (3/4)	+	+	-	+	+

3.1.3 Regulation der genomischen Insel Trb-1 bei *L. pneumophila* Corby

3.1.3.1 Molekularbiologische Untersuchungen zur Regulation von Trb-1: *in vitro*

Die genomische Insel Trb-1 codiert für eine *Legionella vir* Region (*lvr*), die die Gene *lvrR* (*lpc2816*), *lvrA* (*lpc2815*), *lvrB* (*lpc2814*) und *lvrC* (*lpc2813*) umfasst (Abb. 9A). Das Gen *lvrR* codiert für einen putativen Phagen Regulator und die Gene *lvrA* und *lvrB* codieren für Proteine mit unbekannter Funktion. Bei *lvrC* handelt es sich um ein Protein, das eine Ähnlichkeit zu CsrA, dem „Carbon storage regulator“, aufweist.

In dieser Arbeit wurde die Funktion der *lvr* Region näher charakterisiert. Zur Untersuchung der Funktion der *Legionella vir* Region dienten die *Lp* Corby Mutanten $\Delta lvrRABC$ (*lpc2816-lpc2813::Km^R*) und $\Delta lvrR$ (*lpc2816::Km^R*). Die Mutante $\Delta lvrRABC$ war bereits vorhanden und die Mutante $\Delta lvrR$ wurde während dieser Arbeit generiert (siehe Methoden, 2.2.2.20 und 2.2.3.4). Als Template für die Vervielfältigung des DNA-Konstrukts diente das rekombinante Plasmid pML58 (siehe Material; 2.1.4). Die Transformanten wurden mittels PCR zunächst auf die eingebaute Km^R-Kassette (LvRr-2816-U/KmR-XbaI-U) und anschließend auf eine vollständige Deletion von *lvrR* (LvRr-2816-Uin/LvRr-2816-Rin) hin untersucht. Die Oligonukleotide -Uin und -Rin wurden so gewählt, dass nur beim „Wildtyp“ *Lp* Corby ein PCR-Produkt amplifiziert wurde. In den folgenden Experimenten wurde bei der Mutante $\Delta lvrRABC$, Klon 1 und bei $\Delta lvrR$, Klon 2 verwendet. Die erste Charakterisierung der $\Delta lvrRABC$ und $\Delta lvrR$ Mutanten erfolgte zunächst über PCR (35 Zyklen), mit chromosomaler DNA (100 ng/μl) als Template. Eine Bestätigung der Ergebnisse erfolgte durch eine dreimalige Wiederholung der PCR-Reaktion. Mit der Primerkombination 2/3 (*trb-2/trb-3*) wurden die Mutanten auf die episomale Form von Trb-1 untersucht. Sowohl bei $\Delta lvrRABC$ (Abb. 11, Spur 1), als auch bei $\Delta lvrR$ (Abb. 11, Spur 2) war im Vergleich zum „Wildtyp“ *Lp* Corby (Abb. 11, Spur 3) deutlich mehr PCR-Produkt vorhanden. Auch der Nachweis des intakten tRNA^{Pro} Gens mit dem Primerpaar 1/4 (*trb-1/trb-4*) zeigte, dass die genomische Insel bei $\Delta lvrRABC$ (Abb. 11, Spur 4) und bei $\Delta lvrR$ (Abb. 11, Spur 5) deutlich häufiger in einer zirkulären episomalen Form vorlag, als dies beim „Wildtyp“ der Fall war (Abb. 11, Spur 6). Zur Untersuchung der chromosomalen Form von Trb-1 dienten die Primerkombinationen 1/2 (*trb-1/trb-2*) und 3/4 (*trb-3/trb-4*). Die chromosomale Form der genomischen Insel war bei $\Delta lvrRABC$ (Abb. 11, Spur 7 und 10) und bei $\Delta lvrR$ (Abb. 11, Spur 8 und 11) mit gleicher Intensivität nachweisbar, wie bei *Lp* Corby (Abb. 11, Spur 9 und 12). Die Ergebnisse der PCR zeigten für die $\Delta lvrRABC$ und $\Delta lvrR$ Mutanten einen ähnlichen Phänotyp. Bei beiden

Mutanten erfolgt die Exzision von Trb-1 aus dem Chromosom deutlich häufiger, als beim „Wildtyp“ *Lp* Corby. Ähnlich zur Integrase Mutante $\Delta int-1$, konnte der Phänotyp der Mutanten $\Delta lvrRABC$ und $\Delta lvrR$ nicht komplementiert werden. Die Ergebnisse der PCR-Reaktion konnten aber jeweils durch eine zweite und unabhängig generierte Mutante bestätigt werden.

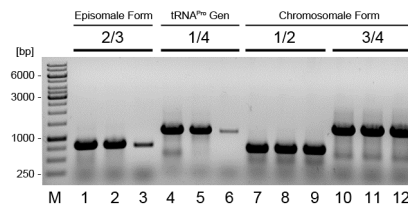


Abb. 11: Semiquantitative Analyse der genomischen Insel Trb-1 mittels PCR (35 Zyklen), beim „Wildtyp“ *L. pneumophila* Corby (Spur 3, 6, 9, 12) und den Deletionsmutanten $\Delta lvrRABC$ (Spur 1, 4, 7, 10) und $\Delta lvrR$ (Spur 2, 5, 8, 11). Als Template diente chromosomale DNA (100 ng/ μ l). Der Nachweis der episomalen Form erfolgte mit dem Primerpaar trb-2/trb-2 und das intakte tRNA^{Pro} Gen wurde mit trb-1/trb-4 amplifiziert. Die chromosomale Form von Trb-1 wurde mit den Primerkombinationen trb-1/trb-2 und trb-3/trb-4 nachgewiesen.

Die Charakterisierung der $\Delta lvrRABC$ und $\Delta lvrR$ Mutanten durch PCR, ermöglichte nur eine semiquantitative Aussage über die Menge der episomalen Form von Trb-1 (Trb-1_{ci}). Daher erfolgte zusätzlich eine relative Quantifizierung der Mutanten mittels Real-time PCR (qPCR). Die relative Anzahl der Kopien von Trb-1_{ci} wurde im Vergleich zur relativen Anzahl der Kopien des chromosomalen Gens *flaA* (*lpc0756*) bestimmt. Für die Bestimmung der relativen Anzahl der Kopien von Trb-1_{ci} wurde neben dem „Wildtyp“ *Lp* Corby, und den beiden *lvr*-Mutanten, auch die Integrase Mutante $\Delta int-1$ herangezogen. Die Quantifizierung der qPCR-Produkte erfolgte wie unter 2.2.2.12 (siehe Methoden) beschrieben. Als Template diente in der qPCR chromosomale DNA (35 ng/ μ l) aus der exponentiellen (E) und der stationären (S) Phase, die aus *Lp* Corby und den Mutanten isoliert wurde. Die Kultivierung der Bakterien in YEB-Medium bei 37°C, zeigte zwischen „Wildtyp“ und den Mutanten $\Delta int-1$, $\Delta lvrRABC$ und $\Delta lvrR$ keine Unterschiede in den Wachstumsphasen (Abb. 12A; siehe Anhang, Tab. 21). Zum Nachweis des chromosomalen Kontrollgens diente das Oligonukleotidpaar RT-flaA-U/RT-flaA-R und die zirkulären episomalen Form von Trb-1 wurde mit dem Primerpaar RT-trb-2R/RT-trb-3U detektiert. Die Berechnung der Anzahl der „Genkopien“ erfolgte durch die Software MxPro (Stratagene), in Abhängigkeit einer Standardkurve. Das Experiment wurde dreimal mit jeweils neu isolierter chromosomaler DNA wiederholt.

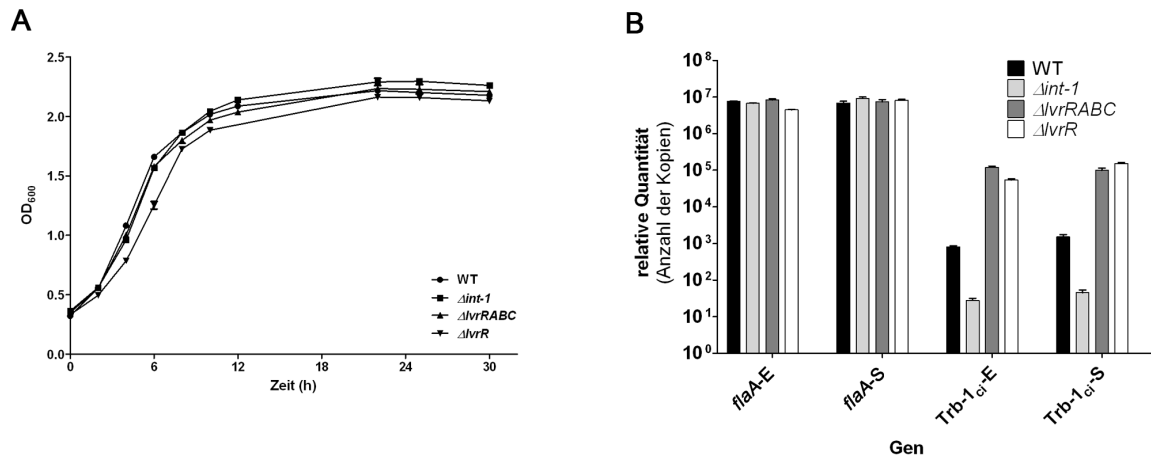


Abb. 12: (A) Wachstum von *L. pneumophila* Corby „Wildtyp“ und der Deletionsmutanten $\Delta int-1$, $\Delta lvrRABC$ und $\Delta lvrR$ in YEB-Medium bei 37°C. (B) Relative Quantifizierung der episomalen Form von Trb-1 (Trb-1_{ci}) beim „Wildtyp“ und den Mutanten $\Delta int-1$, $\Delta lvrRABC$ und $\Delta lvrR$. Als Template diente chromosomale DNA (35 ng/μl) aus der exponentiellen (E) und stationären (S) Phase. Die Messung der amplifizierten dsDNA erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes „Sybr Green“ am Mx3000P (Stratagene). Zum Nachweis von Trb-1_{ci} diente das Primerpaar RT-trb-2 und RT-trb-3. Als chromosomales Kontrollgen wurde *flaA* (*lpc0756*) verwendet. Die relative Anzahl der der Kopien von *flaA* und Trb-1_{ci} wurde in Abhängigkeit einer Standardkurve mit der MxPro Software (Stratagene) berechnet.

Zunächst wurde die relative Anzahl der gemessenen „Genkopien“ von Trb-1_{ci}, im Verhältnis zum chromosomalen Kontrollgen *flaA* bestimmt. Beim „Wildtyp“ *Lp* Corby betrug das Verhältnis der „Genkopien“ von Trb-1_{ci} zu *flaA* in der exponentiellen Phase $1,065 \times 10^{-4}:1$. In der stationären Phase wurde beim „Wildtyp“ ein Verhältnis von $2,122 \times 10^{-4}:1$ errechnet, was einer signifikanten Zunahme der episomalen Form von Trb-1 um den Faktor 1,867 entsprach (Abb. 12B; siehe Anhang, Tab. 23). Bei den *lvr* Mutanten lag Trb-1, im Vergleich zum chromosomalen Gen, deutlich häufiger in einer episomalen Form vor, als dies beim „Wildtyp“ der Fall war. Für $\Delta lvrRABC$ wurde in der exponentiellen Phase ein Verhältnis von $1,472 \times 10^{-2}:1$, für Trb-1_{ci} zu *flaA* bestimmt (Abb. 12B; Tab. 23). Dieses Verhältnis blieb auch während der stationären Phase mit $1,376 \times 10^{-2}:1$ relativ unverändert (Abb. 12B; Tab. 23). Bei $\Delta lvrR$ konnte eine Zunahme der Anzahl der Kopien von Trb-1_{ci}, während der stationären Phase, um den Faktor 2,916 verzeichnet werden (Abb. 12B; Tab. 23). Das Verhältnis der „Genkopien“ von Trb-1_{ci} zum chromosomalen Kontrollgen *flaA*, betrug bei $\Delta lvrR$ in der exponentiellen Phase $1,287 \times 10^{-2}:1$ und in der stationären Phase $1,904 \times 10^{-2}:1$ (Abb. 12B; Tab. 23). Für die Integrase Mutante $\Delta int-1$ konnte mittels qPCR in geringem Maße ebenfalls Trb-1_{ci} detektiert werden. Im Vergleich zum Kontrollgen, war bei $\Delta int-1$ in beiden untersuchten Wachstumsphasen das Verhältnis von Trb-1_{ci} zu *flaA*, ca. $4,1 \times 10^{-6}:1$ (Abb. 12B; Tab. 23). Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass sowohl im „Wildtyp“ *Lp* Corby, als auch in den *lvr*

Mutanten die episomale Form von Trb-1 im Vergleich zu bakteriellen Chromosom, innerhalb einer Bakterienkolonie, in einer deutlich geringeren Kopienzahl vorhanden war. Zusätzlich ging aus den Daten hervor, dass die relative Anzahl an Kopien von Trb-1_{ci} in den *lvr* Mutanten höher war, als beim „Wildtyp“ Stamm. In der exponentiellen Phase lag die Anzahl der episomalen Form von Trb-1 bei $\Delta lvrRABC$ im Vergleich zum „Wildtyp“, durchschnittlich um das 146-fache und in der stationären Phase um das 74-fache höher (Abb. 12B; Tab. 23). Für $\Delta lvrR$ konnte in der exponentiellen Wachstumsphase im Vergleich zum „Wildtyp“ Stamm *Lp* Corby im Durchschnitt eine 68-fache Zunahme der episomalen Form von Trb-1 nachgewiesen werden (Abb. 12B; siehe Anhang, Tab. 23). In der stationären Phase war die relative Anzahl der Kopien von Trb-1_{ci} bei $\Delta lvrR$ um das 125-fache höher, als beim „Wildtyp“ (Abb. 12B; Tab. 23). Durch die relative Quantifizierung mittels qPCR konnten die Ergebnisse der PCR bestätigt werden. Die Deletion von *lvrRABC* oder *lvrR* führt bei einer *Legionella* Kolonie zu einer deutlichen Zunahme der episomalen Form von Trb-1.

3.1.3.2 Molekularbiologische Untersuchung zur Regulation von Trb-1: *in vivo*

Durch die *in vitro* Experimente konnte bereits gezeigt werden, dass die Bildung der episomalen Form bei der genomischen Insel Trb-1 sowohl von der ortsspezifischen Integrase (*int-1*, *lpc2818*), als auch von der *Legionella vir* Region (*lvr*) bzw. dem Genprodukt von *lvrR* (*lpc2816*) abhängig ist. Mit Hilfe des *in vivo* Experiments sollte untersucht werden, ob Trb-1 in den Bakterien auch während der intrazellulären Replikation in *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 in einer zirkulären episomalen Form vorliegt. Untersucht wurde die Bildung der episomalen Form von Trb-1 bei der Mutante $\Delta lvrRABC$ und beim „Wildtyp“ *Lp* Corby. Die Infektion der Amöben erfolgte mit einer MOI von 100, für 22 Stunden bei 37°C (siehe Methoden; 2.2.4.4). Die aus den Bakterien isolierte chromosomale DNA (100 ng/μl) diente für die nachfolgende PCR (35 Zyklen) als Template. Zum Nachweis der episomalen Form von Trb-1 diente das spezifische Primerpaar 2/3 (*trb-2/trb-3*). Die Ergebnisse zeigen, dass die zirkuläre episomale Form der genomischen Insel auch *in vivo* sowohl bei $\Delta lvrRABC$ (Abb. 13, Spur 1), als auch beim „Wildtyp“ (Abb. 13, Spur 2) gebildet wurde. Analog zu den Ergebnissen der *in vitro* Experimente, lag auch während der Replikation in *A. castellanii*, die genomische Insel bei $\Delta lvrRABC$, im Vergleich zum „Wildtyp“, deutlich häufiger in der episomalen Form vor (Abb. 13, vgl. Spur 1 und 2). Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass die Exzision der genomischen Insel Trb-1 aus dem *Legionella* Chromosom und

die Bildung der zirkulären episomalen Form auch während der intrazellulären Replikation in *A. castellanii* erfolgt.

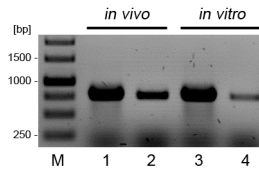


Abb. 13: Nachweis der episomalen Form von Trb-1 während der *in vivo* Replikation in *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 und *in vitro* Replikation auf BCYE Agarplatten, bei der Mutante $\Delta lvrRABC$ (Spur 1 und 3) und dem „Wildtyp“ *L. pneumophila* Corby (Spur 2 und 4). Die Analyse erfolgte mittels PCR in 35 Zyklen und anschließender Agarose-Gelelektrophorese. Als Template diente chromosomale DNA (100 ng/ μ l). Die zirkuläre episomale Form von Trb-1 wurde mit dem Primerpaar trb-2/trb-3 amplifiziert.

3.1.4 Untersuchung zur Expression der Trb-1 codierten Gene

In dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass die *L. pneumophila* Corby Deletionsmutanten $\Delta int-1$ und $\Delta lvrRABC$ einen deutlichen Einfluss auf die Exzision und Bildung der zirkulären episomalen Form der genomischen Insel Trb-1 haben. Mittels Real-time PCR (qPCR) sollte untersucht werden, welche Rolle das Gen *int-1* und die Gene der *Legionella vir* Region (*lvrRABC*) bei der Expression der Trb-1 codierten Gene spielen. Untersucht wurde die Expression der Gene *int-1* (*lpc2818*), *lvrC* (*lpc2813*), *trbB* (*lpc2812*), *traG* (*lpc2801*), *traI* (*lpc2795*), *mutX* (*lpc2794*), *hsdM* (*lpc2790*), *recB* (*lpc2785*), *traR* (*lpc2784*) und *lpc2819* ,in der exponentiellen (E) und postexponentiellen (PE) Phase. Die aus der E- und PE-Phase isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und diente als Template für die qPCR (siehe Methoden, 2.2.2.4 ff). Als interne Kontrolle und zur Normalisierung der Daten diente das Haushaltsgen *gyrA*. Das Gen *flaA* fungierte als Kontrolle für die Bestimmung der richtigen Wachstumsphase, da die Expression von *flaA* in der postexponentiellen Phase stark zunimmt. Alle Oligonukleotide, die in dieser Studie verwendet wurden, sind in Tabelle 7 aufgelistet. (siehe Material 2.1.5). In jedem Experiment wurde jede Probe dreimal unabhängig voneinander getestet. Das Experiment wurde insgesamt dreimal mit jeweils neu isolierter RNA wiederholt. Für die Berechnung der Anzahl der Moleküle diente die MxPro Software (Stratagene). Die Expression der Gene für den „Wildtyp“ *Lp* Corby und die Mutanten $\Delta int-1$ und $\Delta lvrRABC$ ist in Tabelle 15 aufgelistet. Bei den angegebenen Werten für die Expression der einzelnen Gene, handelt es sich jeweils um den

Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Beim „Wildtyp“ Stamm war die Expression des Gens *lvrC* in der PE-Phase um das ca. 2,2-fache und bei *trbB* um das ca. 2,4-fache stärker, als in der E-Phase. Für das Gen *mutX* wurde beim „Wildtyp“ eine ca. 7,3-fache Zunahme der Genexpression verzeichnet. Dieser Wert war jedoch statistisch nicht signifikant. Die Expression der anderen untersuchten Trb-1 Gene war bei *Lp* Corby in beiden Wachstumsphasen relativ gleich (Tab. 15). Im Vergleich zum „Wildtyp“ wurde bei der Integrase Mutante $\Delta int-1$ das Gen *lpc2819* in der E-Phase um das 3,5-fache stärker exprimiert. Für die restlichen Trb-1 Gene konnten in der E-Phase, im Vergleich zum „Wildtyp“, keine Unterschiede in der Genexpression festgestellt werden. In der PE-Phase war bei der Integrase Mutante die Expression aller untersuchten Gene, mit Ausnahme von *lpc2819* und *hdsM*, reduziert. Die statistische Auswertung zeigte jedoch, dass die Werte, ausgenommen der Wert für *lpc2819*, nicht signifikant waren (Tab. 15). Bei der Mutante $\Delta lvrRABC$ wurde das Gen *int-1* im Vergleich zum „Wildtyp“ in der E-Phase ca. um das 2,6-fache stärker exprimiert. Während der PE-Phase war bei $\Delta lvrRABC$ die Expression von *int-1* nur um das 1,8-fache erhöht (Tab. 15). Die Gene *trbB* und *traG* wurden bei der Deletionsmutante $\Delta lvrRABC$ während der E-Phase um das 4,4-fache bzw. um das 2,7-fache stärker exprimiert als beim „Wildtyp“ (Tab. 15). Während der PE-Phase war *trbB* ebenfalls um das 3,9-fache hochreguliert. Für *traG* konnte hingegen in dieser Wachstumsphase keine Erhöhung der Genexpression festgestellt werden (Tab. 15). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass bei $\Delta lvrRABC$ die Hochregulierung von *trbB* und *traG* auf die Km^R-Kassette zurückzuführen ist. Interessanterweise war bei $\Delta lvrRABC$ in der PE-Phase die Expression von *mutX*, im Vergleich zu den anderen untersuchten Trb-1 Genen, deutlich herunterreguliert. Dieser Wert war jedoch statistisch nicht signifikant (Tab. 15). Die Gene *traI*, *hdsM*, *recB*, *traR* und *lpc2819* wurden bei $\Delta lvrRABC$ in beiden untersuchten Wachstumsphasen, im Vergleich zum „Wildtyp“, relativ gleich gut exprimiert (Tab. 15). Insgesamt konnte beim „Wildtyp“ *Lp* Corby und bei den Mutanten $\Delta int-1$ und $\Delta lvrRABC$ nur für einzelne der untersuchten Trb-1 Gene signifikante Unterschiede in der Genexpression festgestellt werden. Auch der Vergleich der Genexpression in den Wachstumsphasen zeigte, dass beim „Wildtyp“ nur drei (*lvrC*, *trbB*, *mutX*) der insgesamt zehn untersuchten Gene deutlich stärker in der postexponentiellen Phase transkribiert wurden.

Tab. 15: Untersuchung der Expression der Trb-1 Gene beim „Wildtyp“ *L. pneumophila* Corby und den Mutanten $\Delta int-1$ und $\Delta lvrRABC$ mittels Real-time PCR (qPCR). Die Expression der Gene wurde wie folgt klassifiziert: hoch reguliert >2,0; runter reguliert <0,5 und „Fett“ markiert. Die Signifikanz (P-Werte; $P < 0,05$) wurde mit dem t-Test bestimmt und ist angegeben durch: signifikante Werte * <0,001; ** <0,01; * <0,05 und nicht signifikante Werte „ns“ >0,05.**

Gene	WT			$\Delta int-1$ vs. WT						$\Delta lvrRABC$ vs. WT					
	postexp. vs. exp. Phase			exponentielle Phase			postexponentielle Phase			exponentielle Phase			postexponentielle Phase		
	Mittelwert	SEM	P-Wert	Mittelwert	SEM	P-Wert	Mittelwert	SEM	P-Wert	Mittelwert	SEM	P-Wert	Mittelwert	SEM	P-Wert
<i>flaA</i>	292,83	198,23	***	1,992	0,495	ns	0,319	0,240		0,933	0,193	ns	0,308	0,153	ns
<i>lpc2819</i>	1,400	0,266	***	3,524	0,800	***	1,399	0,657	***	1,938	0,601	***	0,979	0,381	***
<i>int-1</i>	0,781	0,071	***	-	-	-	-	-	-	2,610	1,071	***	1,856	0,473	***
<i>lvrC</i>	2,176	0,383	***	1,247	0,210	ns	0,309	0,088	ns	-	-	-	-	-	-
<i>trbB</i>	2,351	0,740	***	1,389	0,398	ns	0,316	0,141	ns	4,391	0,680	***	3,910	0,550	***
<i>traG</i>	1,030	0,156	***	1,399	0,646	ns	0,462	0,062	ns	2,740	0,543	**	1,546	0,616	*
<i>traI</i>	1,853	0,146	***	1,133	0,448	ns	0,305	0,053	ns	1,230	0,028	ns	1,252	0,082	***
<i>mutX</i>	7,319	2,624	ns	1,466	0,372	ns	0,330	0,063	ns	1,263	0,227	ns	0,321	0,111	ns
<i>hsdM</i>	0,996	0,370	***	1,347	0,391	ns	0,719	0,640	ns	1,451	0,742	*	1,473	0,539	***
<i>recB</i>	1,238	0,503	***	1,021	0,249	ns	0,370	0,064	ns	1,011	0,267	ns	0,924	0,220	***
<i>traR</i>	0,744	0,379	***	0,877	0,465	*	0,361	0,107	ns	0,921	0,433	ns	1,306	0,377	***

3.1.5 Die Bedeutung von Trb-1 für die Virulenz von *Legionella*

3.1.5.1 Der Einfluss von Trb-1 auf die Virulenz von *L. pneumophila* Corby

In Süßwasserhabitaten dienen freilebende Protozoen der Gattung *Acanthamoeba*, *Hartmanella* oder *Naeglaria*, als natürliche Wirtsorganismen für Legionellen (Fields, 1996). Mit diesem Experiment sollte ein möglicher Einfluss der genomischen Insel Trb-1, auf die Virulenz von *L. pneumophila* Corby untersucht werden. Für die Replikation der Legionellen diente als Wirtsorganismus *Acanthamoeba castellanii* (ATCC 30010).

Die *in vivo* Experimente wurde mit der Mutanten $\Delta int-1$ und $\Delta lvrRABC$ durchgeführt. Bei diesem Versuch stand die Frage im Fokus, in wie weit der Funktionsverlust der Trb-1 spezifischen Integrase (*lpc2818*, *int-1*) und der daraus resultierende Phänotyp der Mutante, auf die Replikationsfähigkeit in *Acanthamoeba castellanii* Einfluss hat. Zudem konnte mit Hilfe der Mutante $\Delta lvrRABC$ untersucht werden, welchen Einfluss die häufigere Exzision und Zirkularisation von Trb-1, für die Replikation der Bakterien im Wirtsorganismus zur Folge haben könnte. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Trb-1 auch während der Replikation in *A. castellanii*, bei *Lp* Corby und bei $\Delta lvrRABC$, als zirkuläre episomale Form vorliegen kann (siehe Ergebnisse, 3.1.3, Abb. 13). Für jedes *in vivo* Experiment wurde die Infektion pro Stamm und pro Zeitpunkt in einem zweifachen Ansatz durchgeführt. Die Amöben wurden jeweils mit einer MOI von 0,01 infiziert (siehe Methoden 2.2.4). Als Kontrollstamm diente immer *Lp* Corby „Wildtyp“. Zunächst wurde die Replikation der $\Delta int-1$ und der $\Delta lvrRABC$ Mutanten in *A. castellanii* über drei Tage hinweg untersucht (Abb. 14A). Die Auswertung des dreitägigen *in vivo* Experiments, zeigte keine Unterschiede in der Replikation zwischen den Mutanten $\Delta int-1$ und $\Delta lvrRABC$. Beide Mutanten replizierten in *A. castellanii* gleich gut und zeigten in ihrer Virulenz keine Unterschiede zum „Wildtyp“ (Abb. 14A). In einem zweiten Infektionsversuch wurde die Replikationsfähigkeit von $\Delta int-1$ und $\Delta lvrRABC$ über 24 Tage hinweg bestimmt (Abb. 14B). Der Vergleich der CFU-Werte zeigte, dass die Mutanten in *A. castellanii* auch über einen Zeitraum von 24 Tagen in gleichem Masse gut replizierten. Ein Unterschied bei der Replikation zwischen Mutanten und dem „Wildtyp“ von *Lp* Corby war auch bei diesem *in vivo* Experiment nicht erkennbar (Abb. 14B).

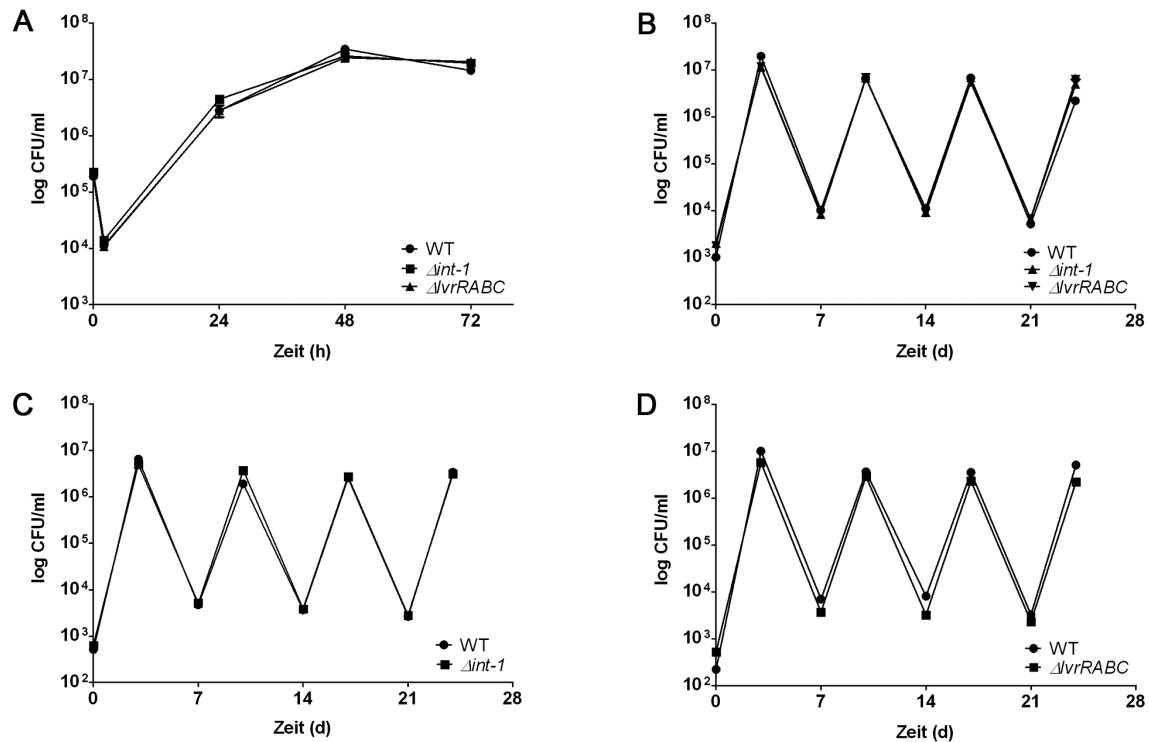


Abb. 14: *In vivo* Experimente mit *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010, bei 37°C mit 5% CO₂. (A) Replikation von *L. pneumophila* Corby „Wildtyp“ und der Deletionsmutanten $\Delta int-1$ und $\Delta lvrRABC$ für 72 h. (B) Replikation von *Lp* Corby „Wildtyp“, $\Delta int-1$ und $\Delta lvrRABC$ für 24 Tage. (C) Replikation von *Lp* Corby und $\Delta int-1$ bei gleichzeitiger Infektion der Wirtszellen. (D) Replikation von *Lp* Corby und $\Delta lvrRABC$ bei gleichzeitiger Infektion der Wirtszellen.

In einem „Competitionassay“ wurde die Replikation der Mutanten $\Delta int-1$ bzw. $\Delta lvrRABC$ gegenüber dem „Wildtyp“ von *Lp* Corby, während der Infektion von *A. castellanii* untersucht (Abb. 14C und D). Bei diesem *in vivo* Experiment konkurrierten Mutante und „Wildtyp“ während der Infektion um die gleichen Wirtszellen. Für den „Competitionassay“ wurden die Mutante und der wildtypische Stamm in gleichem Verhältnis gemischt. Die Ergebnisse des Experiments zeigen, dass bei einer Konkurrenz zwischen der Mutante $\Delta int-1$ und dem „Wildtyp“ *Lp* Corby, um die gleichen Wirtszellen, beide Stämme in *A. castellanii* gleichermaßen gut replizieren konnten (Abb. 14C). Auch bei einer Konkurrenz zwischen $\Delta lvrRABC$ und „Wildtyp“, konnte bei der Replikation der Bakterien in *A. castellanii*, kein Unterschied festgestellt werden (Abb. 14D). Insgesamt zeigen die Ergebnisse aus den *in vivo* Experimenten, dass sowohl $\Delta int-1$, als auch $\Delta lvrRABC$, in *A. castellanii* mit gleicher Effizienz, wie der „Wildtyp“ *Lp* Corby, replizieren konnten.

3.1.5.2 Der Einfluss von Trb-1 auf die Virulenz von *L. oakridgensis*

Die Genome der beiden Stämme, *L. oakridgensis* ATCC 33761 (*loa*) und *L. oakridgensis* RV2-2007 (*lor*), wurden von unserer Arbeitsgruppe sequenziert. Eine Nähere Analyse der Sequenzen zeigte, dass der Stamm ATCC 33761 im Chromosom für ein Lvh-System codiert. Ein Element, das eine Ähnlichkeit zum Typ IVASS von Trb-1 aufweist, wurde bei diesem Stamm nicht identifiziert (unveröffentlichte Daten). In diesem Experiment sollte durch die Konjugation von Trb-1, ein möglicher Einfluss der genomischen Insel, auf die Virulenz von *L. oakridgensis* ATCC 33761 untersucht werden. Bei der Konjugation diente der „wildtypische“ Stamm *Lp* Corby WT^o als Donor. Der *L. oakridgensis* Stamm ATCC 33761 fungierte als Rezipient. Die Konjugation erfolgte bei 30°C mit DNase I (1 µg/ml). Für die Selektion der Transkonjuganten wurden BCYE Agarplatten mit Kanamycin und ohne L-Cystein verwendet. *L. oakridgensis* benötigt im Gegensatz zu *Lp* Corby, für das extrazelluläre Wachstum kein L-Cystein (Orrison et al., 1983). Eine Transkonjugationsrate wurde hier nicht bestimmt. Die Charakterisierung der Transkonjuganten (TK) erfolgte zunächst über PCR, unter Verwendung spezifischer Primer (siehe Material, Tab. 7) und Agarose-Gelelektrophorese. Über das Gen *loa_orf0933*, welches für die Serin-O-Acetyltransferase von *L. oakridgensis* codiert, wurde ermittelt in wie fern es sich bei den Transkonjuganten um den ursprünglichen Donor oder Rezipienten handelte (Abb. 15A). Anschließend wurden die Transkonjuganten auf das Lvh-System spezifische Gen *lvhB4* hin untersucht (Abb. 15A, Spur 9-11) Zum Nachweis der genomischen Insel Trb-1 dienten die Gene *traG* (Abb. 15B, Spur 1-3) und *traM* (Abb. 15B, Spur 9-11). Die Ergebnisse der PCR zeigten, dass Trb-1 von *Lp* Corby in den Stamm *L. oakridgensis* ATCC 33761 konjugiert werden konnte. Nach der Konjugation lag die genomische Insel Trb-1 in den Transkonjuganten in einer zirkulären episomalen Form vor (Abb. 16A, Spur 1). Der Nachweis der zirkulären Form erfolgte was durch das Primerpaar *trb-2/trb-3*. Das Lvh-System von *L. oakridgensis* besteht aus drei genomischen Bereichen, die jeweils durch eine *attR* Rekombinationsstelle getrennt sind (unveröffentlichte Daten). Für das Lvh-System konnten sowohl beim Rezipienten, als auch bei den TK zwei episomale Formen nachgewiesen werden (Abb. 16A, Spur 6 und 11). In einem weiteren Experiment wurden die Stabilität der konjugierten Insel und eine mögliche Inkompatibilität von Trb-1 und des Lvh-Systems untersucht. Hierfür wurden die Transkonjuganten zehnmal passagiert. Als Wachstumsmedium wurden BCYE Agarplatten ohne L-Cystein und mit und ohne Kanamycin verwendet. Die Transkonjuganten wurden jeden zweiten bis dritten Tag auf neue Agarplatten überstrichen. Die Ergebnisse der PCR zeigten, dass das konjugierte Element Trb-1 in den

Transkonjuganten auch nach zehn Passagen noch nachweisbar war. Die Kontrolle auf Trb-1 erfolgte hier ebenfalls über die Gene *traG* (Abb. 15B; Spur 4-6) und *traM* (Abb. 15B, Spur 12-14). Die episomale Form von Trb-1, war in den bakteriellen Zellen ebenfalls detektierbar (Abb. 16A, Spur 2). Nach zehnmaliger Passage waren bei den Transkonjuganten sowohl das Gen *lvhB4* (Abb. 15A, Spur 12-14), als auch zwei episomale Formen des Lvh-Systems nachweisbar (Abb. 16A, Spur 7 und 12). Alle Ergebnisse der PCR-Analysen wurden in Tabelle 16 zusammengefasst. Eine Inkompatibilität von Trb-1 und dem Lvh-System konnte hier nicht nachgewiesen werden. Durch die Konjugation von Trb-1 in *L. oakridgensis* ATCC 33761, wurde ein Stamm generiert, der sowohl das Konjugationssystem von Trb-1, als auch das Lvh-System besaß.

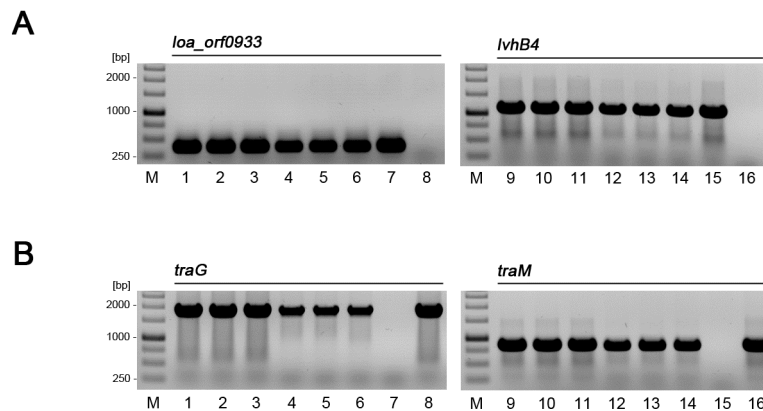


Abb. 15: Ergebnisse der Analyse der Transkonjuganten (TK) mittels PCR (35 Zyklen). Als Template diente chromosomale DNA (100 ng/μl). Untersucht wurden folgende Transkonjuganten: TK1 (Spur 1 und 9), TK3 (Spur 2 und 10) und TK4 (Spur 3 und 11), sowie die entsprechenden Transkonjuganten nach 10-maliger Passage auf BCYE Agarplatten ohne L-Cystein: TK1/10 (Spur 4 und 12), TK3/10 (Spur 5 und 13) und TK4/10 (Spur 6 und 14). Als Kontrollen dienten der Rezipient *L. oakridgensis* ATCC 33761 (Spur 7 und 15) und der Donor *L. pneumophila* Corby WT^o (Spur 8 und 16). (A) Kontrolle der Transkonjuganten auf das chromosomale *L. oakridgensis* ATCC 33761 Gen *loa_orf0933* (Loak-orf0933-U/Loak-orf0933-R) und das Lvh Gen *lvhB4* (Loak-lvhB4-U/Loak-lvhB4-R). (B) Kontrolle der Transkonjuganten auf die Trb-1 Gene *traG* (TraG-F/TraG-R) und *traM* (TraM-F/TraM-R).

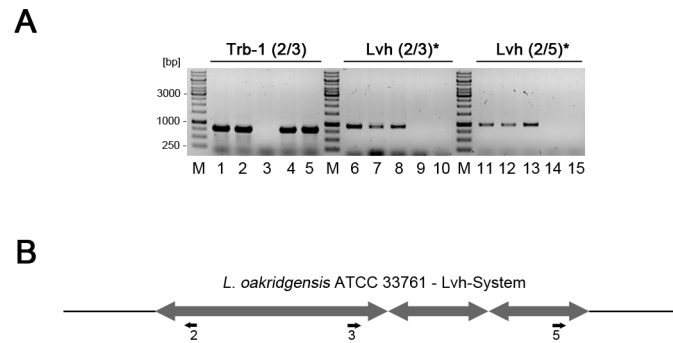


Abb. 16: (A) Die Kontrolle der Transkonjuganten (TK) auf die episomale Form von Trb-1, erfolgte mit dem Primerpaar 2/3 (trb-2/trb-3). Das PCR-Produkt wurde in 35-Zyklen amplifiziert. Zum Nachweis der episomalen Formen des Lvh-Systems dienten die Primerkombinationen 2/3 (Loak-lvh-2R/Loak-lvh-3U) und 2/5 (Loak-lvh-2R/Loak-lvh-5U) in einer PCR mit 40-Zyklen. Die episomalen Formen von Trb-1 und des Lvh-Systems wurden bei allen hier untersuchten Transkonjuganten nachgewiesen. Dargestellt sind hier nur die Ergebnisse für TK3 (Spur 1, 6, 11) und TK3/10 (Spur 2, 7, 12) und der Kontrollstämme *L. oakridgensis* ATCC 33761 (Spur 3, 8, 13), *Lp* Corby WT^o (Spur 4, 9, 14), *Lp* Corby „Wildtyp“ (Spur 5, 10, 15). (B) Schematische Darstellung des Lvh-Systems von *L. oakridgensis* ATCC 33761. Die Zahlen 1 bis 6 kennzeichnen die Bindungsstellen und die Orientierung der Primer. 2=Loak-lvh-2R; 3=Loak-lvh-3U; 5=Loak-lvh-5U.

Tab. 16: Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Konjugation der genomischen Insel Trb-1 von *L. pneumophila* Corby (Donor) in *L. oakridgensis* ATCC 33761 (Rezipient). Die Charakterisierung der Transkonjuganten (TK) erfolgte über PCR mit 35 bzw. 40-Zyklen (*).

Gen/Primer	Donor	Rezipient	Transkonjuganten			Transkonjuganten (nach 10 Passagen)		
	<i>Lp</i> Corby WT ^o	<i>Loak</i> ATCC 33761	TK1	TK3	TK4	TK1	TK3	TK4
<i>loa_orf0933</i>	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>traG</i>	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>traM</i>	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>lvhB4</i>	-	+	+	+	+	+	+	+
episomale Form Trb-1 (2/3)	+	-	+	+	+	+	+	+
episomale Form Lvh (2/3)*	-	+	+	+	+	+	+	+
episomale Form Lvh (2/5)*	-	+	+	+	+	+	+	+

Im einem *in vivo* Experiment wurde die Replikation der Transkonjuganten in humanen Makrophagen (U-937 Zelllinie) untersucht. Als Kontrollstämme dienten der Donor *Lp* Corby und der Rezipient *L. oakridgensis* ATCC 33761. Zusätzlich wurde auch der Stamm *L. oakridgensis* RV2-2007 als Kontrolle verwendet. Dieser Stamm codiert in seinem Genom für ein genomisches Element, das zum Trb/Tra Konjugationssystem Trb-1 von *Lp* Corby eine hohe Ähnlichkeit aufweist (Abb. 18). Es lagen bereits Daten aus zuvor durchgeführten *in vivo* Experimenten vor. Diese Daten zeigten, dass *L. oakridgensis* RV2-2007 in humanen Makrophagen eine deutlich höhere Virulenz besitzt, als der Stamm ATCC 33761 (unveröffentlichte Daten). Für das *in vivo* Experiment wurden die humanen Makrophagen mit einer MOI von 0,01 nach Versuchsprotokoll infiziert (siehe Methoden, 2.2.4.5). Die Replikation der *Legionella* Stämme, in den humanen Makrophagen, erfolgte über einen Zeitraum von drei Tagen bei 37°C. Der Infektionsversuch wurde pro Stamm und pro Zeitpunkt in zweifachem Ansatz durchgeführt. Die CFU-Werte der Replikation, für die Kontrollstämme *Lp* Corby, *L. oakridgensis* RV2-2007 und *L. oakridgensis* ATCC 33761, entsprachen den vorhergehenden Ergebnissen. Für die Transkonjuganten (TK1, TK3, TK4) konnte im Vergleich zum Rezipienten *L. oakridgensis* ATCC 33761 kein Unterschied in der Virulenz festgestellt werden (Abb. 17). Alle drei untersuchten Transkonjuganten replizierten in den Makrophagen mit gleicher Effizienz, wie der Rezipient (Abb. 17). Ein Zusammenhang zwischen der Virulenz und der genomischen Insel Trb-1, konnte in diesem Versuch nicht nachgewiesen werden. Die Ergebnisse wurden durch zwei weitere Versuche bestätigt.

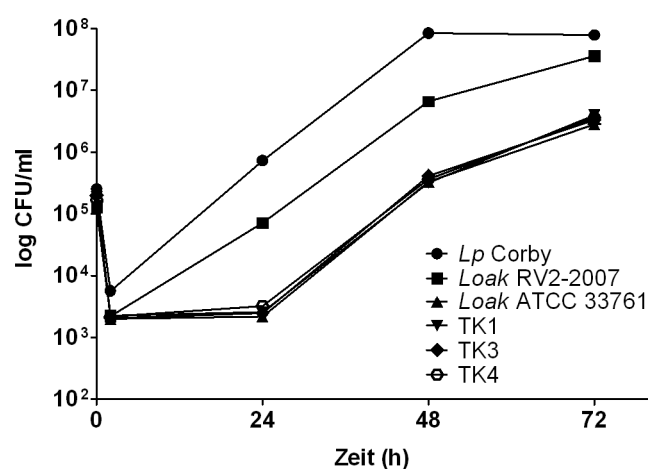


Abb. 17: Replikation von *L. pneumophila* Corby, *L. oakridgensis* RV2-2007, *L. oakridgensis* ATCC 33761, und der Transkonjuganten (TK1, TK3 und TK4) in humanen Makrophagen (U-937), bei 37°C und 5 % CO₂.

3.1.6 Die Verbreitung von Trb-1 in der Gattung *Legionella*

Die genomische Insel Trb-1 codiert für ein funktionelles Trb/Tra Konjugationssystem (Glöckner et al., 2008). In früheren Studien und in dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass Trb-1 in den *L. pneumophila* Stamm Philadelphia-I und in die „nicht“-*pneumophila* Stämme *L. micdadei*, *L. hakeliae* und *L. oakridgensis* konjugiert werden kann (Glöckner et al., 2008; Lautner, 2008). Ein interessanter Aspekt dieser Arbeit war, die Frage nach dem Vorkommen der genomischen Insel Trb-1 in anderen *Legionella* Stämmen. Die bereits sequenzierten und publizierten *Legionella* Genome wurden auf Gene hin untersucht, die für ähnliche Trb/Tra Proteine codieren. Des Weiteren wurden die genomische Organisation und die Insertionsstelle, der zu Trb-1 ähnlichen genomischen Inseln, mittels *in silico* Analyse untersucht (Abb. 18).

Im Genom von *L. pneumophila* Alcoy ist die genomische Insel DT2 lokalisiert (D'Auria et al., 2010). DT2 ist innerhalb einer tRNA^{Pro} integriert. Die genomische Insel umfasst die Gene *lpa00789* bis *lpa00840* und weist eine ähnliche genomische Organisation auf, wie Trb-1. Alle Gene der Region I von Trb-1 liegen auch bei DT2 in gleicher Organisation und Orientierung vor (Abb. 18). Das von DT2 codierte Trb/Tra Konjugationssystem ist zu 86 bis 100 % mit demjenigen von Trb-1 identisch. Die Proteinsequenz, der von DT2 codierten Integrase (*lpa00790*), ist zu 100 % mit der Trb-1 Integrase (*lpc2818*) identisch. Unterschiede in der genomischen Organisation wurden beim Vergleich der Region II von DT2 mit der Region II von Trb-1 festgestellt. DT2 codiert ebenfalls für das Typ I Restriktionssystem (*hsdMSR*). Die Genprodukte von *hsdM* (*lpa00829*) und *hsdR* (*lpa00832*) sind zu den von Trb-1 codierten Proteinen zu 97 % bzw. 98 % ähnlich. Zwischen den Sequenzen des HsdS Proteins von DT2 (*lpa00830*) und dem Trb-1 codierten Protein (*lpc2789*), besteht hingegen nur eine Übereinstimmung von ca. 30 %. Für die Trb-1 Gene *lpc2787* und *lpc2786*, konnten auf DT2 keine ähnlichen Proteine identifiziert werden. An dieser Stelle sind auf DT2 die Gene *lpa00833* und *lpa00834* lokalisiert, die für Genprodukte mit unbekannter Funktion codieren. Die von Trb-1 codierte Transposase (*lpc2783*; TP3) fehlt auf der genomischen Insel DT2 vollständig. Hingegen sind die Trb-1 Gene *recB*, *traR* und *lpc2782* bis *lpc2779* auf DT2 ebenfalls lokalisiert.

Der *L. oakridgensis* Stamm RV2-2007 wurde vor kurzem von unserer Arbeitsgruppe sequenziert. Bei der Analyse des Genoms wurde ein Trb/Tra Konjugationssystem identifiziert, das auf der genomischen Insel LoRV-Trb-1 codiert ist. Die genomische Insel besitzt eine Größe von ca. 33.500 bp und ist ebenfalls innerhalb eines tRNA^{Pro} Gens insertiert. LoRV-Trb-

1 weist eine ähnliche genomische Organisation auf, wie die genomische Insel von *Lp* Corby. Die *trb/tra* Region des *L. oakridgensis* Stammes ist zu 91 bis 98 %, mit der von Trb-1 codierten Region identisch. Hingegen fehlen auf LoRV-Trb-1 die Gene *mutT* und *mutX*, die bei *Lp* Corby auf Trb-1, zwischen den Genen *traC* und *traH* lokalisiert sind. Anstelle von MutT und MutX ist beim *L. oakridgensis* Stamm ein Protein mit unbekannter Funktion codiert (Abb. 18). Der Vergleich von LoRV-Trb-1, mit der genomischen Insel von *Lp* Corby, zeigt vor allem Unterschiede innerhalb der Region II. Von den Genen des Typ I Restriktionssystems, ist auf LoRV-Trb-1 nur eine Nukleotidsequenz vom 5'-Ende des Gens *hsdM* vorhanden. Gene mit einer Ähnlichkeit zu *hsdS*, *hsdR*, *lpc2787* und *lpc2786*, fehlen auf der genomischen Insel von *L. oakridgensis* vollständig. An dieser Stelle codiert *L. oakridgensis* für Proteine mit unbekannter Funktion. Ebenso ist von *recB* lediglich ein Teil der DNA-Sequenz vom 3'-Ende des Gens auf LoRV-Trb-1 codiert. Die auf Trb-1 lokalisierten Gene *traR* und *lpc2783* bis *lpc2779* sind ebenfalls auf der genomischen Insel von *L. oakridgensis* codiert (Abb. 18).

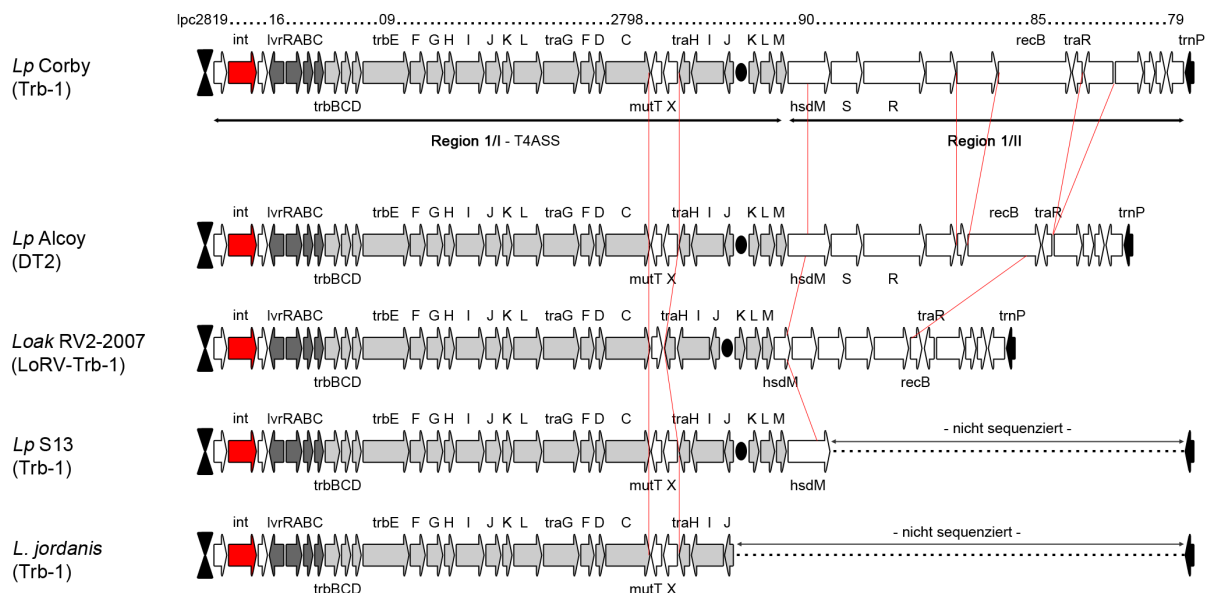


Abb. 18: Genomische Organisation von Trb-1 bei *L. pneumophila* Corby und den *Legionella* Stämmen *Lp* Alcoy, *L. oakridgensis* RV2-2007, *Lp* S13 und *L. jordanis*. Die *trb/tra* Gene sind in hellgrau, die *Legionella vir* Region *lvrRABC* in dunkelgrau und das für die Integrase codierende Gen ist als roter Pfeil dargestellt.

Für die Stämme *Lp* S13 und *L. jordanis* existiert bisher kein vollständig sequenziertes Genom. Die *trb/tra* Region wurde bei beiden Stämmen mittels spezifischer Primerpaare sequenziert. Ein Teil der Region wurde bereits während einer früheren wissenschaftlichen Studie teilweise sequenziert (Ott, 2009). Die Sequenzierung für den noch fehlenden DNA-Bereich, *trbE bis trbI*, wurde für *Lp* S13 und *L. jordanis* in dieser Arbeit vervollständigt. Die hierfür verwendeten spezifischen Primerpaare sind in Tabelle 7 aufgelistet (siehe Material, 2.1.5). Die Auswertung der Ergebnisse zeigte, dass im Genom beider Stämme ein Trb/Tra Konjugationssystem lokalisiert ist, das zu ca. 92 bis 99 % zum Trb-1 codierten System von *Lp* Corby ähnlich ist. Die genomische Organisation der *trb/tra* Region von *Lp* S13 ist zur Region I von Trb-1 identisch. Ein Homolog des Gens *hsdM*, wurde auch auf dem Trb-1 ähnlichen genomischen Element von *Lp* S13 identifiziert. Bei *L. jordanis* erfolgte die Sequenzierung der *trb/tra* Region bis einschließlich *traJ*. Die genomische Organisation der sequenzierten *trb/tra* Gene war bei *L. jordanis* ähnlich zu Trb-1. Beide Stämme codieren jeweils für eine spezifische Integrase, die zur Trb-1 Integrase Int-1 (*lpc2818*) ähnlich ist. Die Proteinsequenz, der von *Lp* S13 codierten Integrase, stimmt zu 98 % und die von *L. jordanis* codierte Integrase, zu 96 %, mit der Sequenz von Int-1 überein.

Die *Legionella* Stämme *Lp* 130 b und *L. longbeachae* NSW150 codieren in ihrem Genom ebenfalls für eine *trb/tra* Region (Cazalet et al., 2010; Schroeder et al., 2010). Die genomischen Inseln mit den Trb/Tra Systemen, besitzen bei beiden Stämmen einen anderen Integrationsort als Trb-1. Bei *Lp* 130b ist das Trb/Tra System auf der genomischen Element ROD (150 kb) codiert. ROD ist innerhalb des tRNA^{Arg} Gens integriert und weist eine andere genomische Organisation auf, als Trb-1. Die auf ROD codierte *trb/tra* Region ist nur zu ca. 76 %, mit derjenigen von Trb-1 identisch. Im Genom von *L. longbeachae* NSW150 ist die genomische Insel GI-2 codiert, die innerhalb des tRNA^{Met} Gens inseriert ist. Die *trb/tra* Regionen von GI-2 und Trb-1 sind nur zu etwa 75 % ähnlich. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass zu Trb-1 ähnliche genomische Inseln bzw. Elemente sowohl bei *L. pneumophila*, als auch bei anderen *Legionella* Stämmen verbreitet sind.

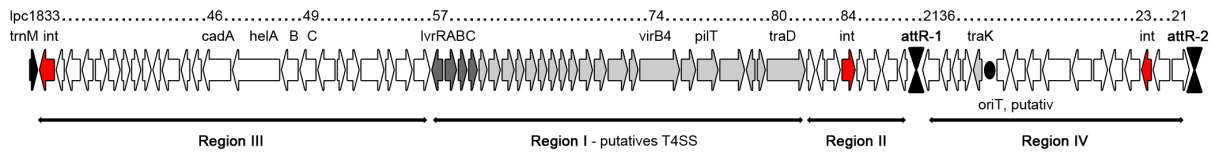
3.2 Charakterisierung von LpcGI-2 bei *L. pneumophila* Corby

3.2.1 Die Analyse von LpcGI-2

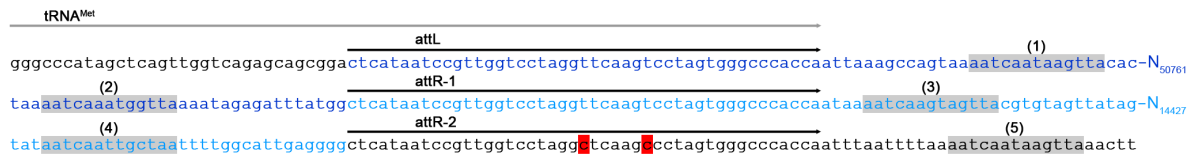
Neben Trb-1 und Trb-2, wurde im Chromosom von *L. pneumophila* Corby die genomische Insel LpcGI-2 identifiziert (Abb. 19A). Die Insel ist 65.401 bp groß und hat einen G+C-Gehalt von ca. 39,5%. Der G+C-Gehalt der Insel ist somit etwas höher, als der G+C-Gehalt des *Lp* Corby Genoms, der bei 38% liegt. LpcGI-2 ist innerhalb des tRNA Gens für Methionin (*lpc1832*; *trnM*; tRNA^{Met}) insertiert. Der Aufbau der genomischen Insel wurde für die Regionen I, II und III (*lpc1833* bis *lpc1888*) bereits in einer vorangegangenen wissenschaftlichen Arbeit (Lautner, 2008) beschrieben. Durch eine nachträgliche Neuordnung von DNA-Segmenten, im bereits publizierten Genom von *Lp* Corby (Glöckner et al., 2008), konnte in dieser Arbeit mittels *in silico* Analyse die Region IV (14.534 bp, *lpc2136* bis *lpc2121*), als Teil der genomischen Insel LpcGI-2, identifiziert werden. Die Region IV codiert für zwei Transposasen, eine TpnA (*lpc2136*) und eine IS652 Transposase (*lpc2127*). Des Weiteren codiert das Element für ein TraK Protein (*lpc2132*), zwei putative Dot/Icm-Effektoren (*lpc2128* und *lpc2130*), einen Transkriptionsregulator, der LysR-Transporter Familie und eine Prophagen CP4-6 Integrase (*lpc2123*). Die restlichen Gene der Region IV codieren für Proteine mit unbekannter Funktion. Für diese Proteine konnte mittels „blastp“ über NCBI eine Ähnlichkeit zu Proteinen von *Lp* 130b (*lpc2133*), *Lp* Paris (*lpc2131*, *lpc2129*), *Lp* Alcoy (*lpc2125*, *lpc2124*, *lpc2121*) und *L. longbeachae* NSW150 (*lpc2126*) festgestellt werden (siehe Anhang, Tab. 26). Zudem wurde zwischen den Genen *traK* und *lpc2131* eine putative *oriT*-Region identifiziert. Diese kurze DNA-Sequenz umfasst zehn Nukleotidbasen (5'-ATCTTGCCCT-3') und ist ähnlich zur TraI-Bindestelle von Trb-1 (siehe Diskussion, 4.2.2; Abb. 34). Innerhalb der Regionen I, II und III von LpcGI-2 wurde keine *oriT*-Region bzw. eine ähnliche Nukleotidsequenz gefunden.

Für die weitere *in silico* Charakterisierung wurden zunächst die flankierenden DNA-Sequenzen von LpcGI-2 genauer betrachtet. Es wurden eine *attL* und zwei *attR* (*attR-1* und *attR-2*) Rekombinationsstellen identifiziert (Abb. 19A und B). Demnach ist LpcGI-2 aus zwei genomischen Elementen zusammengesetzt, einem größeren (A, *lpc1833* bis *lpc1888*) und einem kleineren Element (B; *lpc2136* bis *lpc2121*).

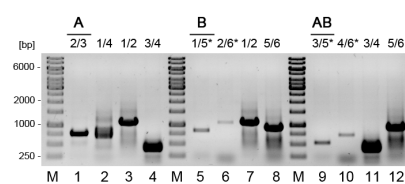
LpcGl-2 (65.401 bp)



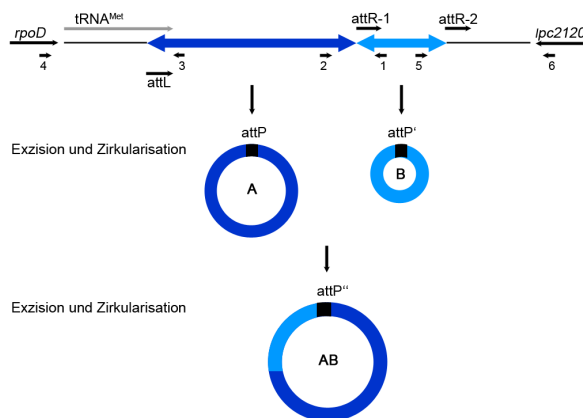
B



C



D



E

Episomale Form: A

...ATTGATAATTACCTCATAAGAAGCTAAAAAGCCTCGCGTGAGATT
 TCGGTGTTTGAGTAGCAGCAGTAGCCGCAATATACGCCAATTGTAGTGGT
 TGTTAGCGAGCAAATTCATATAAATAAATAAATGGTTTAAATAGAGATT
 ATGGCTCATATCCGTGGTCTGAGTTCAGTCTAGTGAGGCCACCAA
 TTAAGCCGCAATAAATCAATAAGTTTACACTTGAAACCTTGATCACCTCAA
 AAGTCCTCGGTGACTTTTACGTGAGGCAATTCGCGTCGCGCGCCA
 TCGCGCGCGGAGCATCGCAGATCGACGCCCAATTGCGCCTATGAGCA...

Episomale Form: B

...TGCAAGCACAGTATTATTGAGCAATGGAAATTTTATCAGAGAGAACTTA
AATAATGTCATTATTTCAGTCAAATTTCTAAACCACTAATATTTGTAGT
AATTCTCGTATAAAAAATCAATATATCAATATGCATATTTTGGCATTG
AGGGGGTCATAATCCGTTGGTCTAGCTCAAGCTTATGGGCCCACCA
ATAAATCAAGTAGTTTTCGTATAGTTATAGAGGGCGCAATTTAGGCTCTT
TCCCTATTAAGGGGGAGTCTTTAATCACCCGACAGGACCTGCTCAACG
ACTCATATAATTTTCAAATCTTAAACCAATAGCCGCTCGCTGAAC...
(4)
(3)
atP^a

Episomale Form: AB

... .CAGCACAAGTATTTGAGCAATGGAATTTTATCAAAGAGAACTTAA
TAATGTCATTATTTCAGTCAAATTCTAAACAACTAATATTTTGAGTTAA
TTCCTGCTATAAAATCAATATAATCAATTGTAATTTTGGCATTGAG
GGGCTCATAATCGTGGTGGCTTAGCTCAAGCTAGTGGGCCCAAT
TAAAGCCGATAAATATCAATAGTTACACTTGACCAACCTTAGTCACCTCAA
AGTCTTCGCTGGCTACTTTTACGAGACCTCAACTAGTATTCGCGGCC
CTCGAGTGTGACCAATATGGGAGAGCTTCAACAGTGTGGATGCTAA...

Abb. 19: (A) Genetische Organisation der genomischen Insel LpcGI-2 bei *L. pneumophila* Corby. (B) Darstellung der Integration von LpcGI-2 in das tRNA^{Met} Gen mit den Rekombinationsstellen *attL*, *attR*-1 und *attR*-2 (schwarze Pfeile). Abweichungen in der DNA-Sequenz der *attR*-Sequenzen zu *attL*, sind rot markiert. LpcGI-2 besteht aus den zwei Elementen A (blaue Sequenz) und B (hellblaue Sequenz). Chromosomale DNA ist in schwarzer Schrift dargestellt. Die Zahlen 1, 2, 3, 4 und 5 kennzeichnen die IHF-Konsensussequenz WATCAANNNTTR (W=dA oder dT; R=dA oder dG; N=jedes Nukleotid), die mit grau hinterlegt ist. (C) Ergebnisse der PCR Analyse von LpcGI-2. Zum Nachweis der episomalen Formen A, B und AB diente die Primerpaare 2/3 (Spur 1), 1/5 (Spur 5) und 3/5 (Spur 9). Das intakte tRNA^{Met} Gen wurde mit dem Primerpaar 1/4 (Spur 2) und 4/6 (Spur 10) und *attB*^c mit 2/6 (Spur 6) detektiert. Die chromosomale Form der genomischen Insel wurde mit den Primerkombinationen 1/2 (Spur 3 und 7), 3/4 (Spur 4 und 11) und 5/6 (Spur 8 und 12) nachgewiesen. Die PCR-Produkte wurden in 35 Zyklen bzw. 40 Zyklen (*) amplifiziert. (D) Mechanismus bei der Bildung der zirkulären episomalen Formen A, B und AB von LpcGI-2. Bei der Exzision rekombinieren die Rekombinationsstellen *attL* und *attR*-1 bzw. *attR*-2 zu *attP*, *attP*^c bzw. *attP*^{cc}. Die Zahlen 1 bis 6 kennzeichnen die Orientierung und die Hybridisierungsstellen der Primer. 1=LpcGI-2-1U; 2=LpcGI-2-2R; 3=LpcGI-2-3U; 4=LpcGI-2-4R; 5=LpcGI-2-5R; 6=LpcGI-2-6U. (E) Nukleotidsequenz von *attP*, *attP*^c und *attP*^{cc} (schwarzer Pfeil) bei den zirkulären Formen von LpcGI-2. Dargestellt sind IHF-Sequenzen (grau hinterlegt), die DNA-Sequenzwiederholungen NTTTN (unterstrichen) und die IR-Sequenz (grüne Pfeile).

Wenn LpcGI-2 in das bakterielle Chromosom integriert ist, dann wird die genomische Insel auf der linken und rechten Seite von *attL* und *attR-2* flankiert. Die *attR-1* Sequenz ist zwischen den Genen *lpc1888* und *lpc2136* lokalisiert und *attR-2* befindet sich zwischen *lpc2121* und *lpc2120* (Abb. 19A). Die Rekombinationsstellen haben eine Länge von 45 bp. Ein Vergleich der DNA-Sequenzen von *attL*, *attR-1* und *attR-2* zeigte, dass die Nukleotidsequenzen von *attL* und *attR-1* identisch sind (Abb. 19B). In der DNA-Sequenz von *attR-2* wurden an zwei Positionen Unterschiede zu *attL* und *attR-1* festgestellt. Vom 5'→3'-Ende der Rekombinationsstellen, befindet sich an den Positionen 23 und 29 bei *attR-2* anstelle eines dT jeweils ein dC (Abb. 19B; rot markierte Nukleotide). Neben der Identifizierung der Rekombinationsstellen, war auch die Frage von Interesse, in wie weit noch weitere Motive für DNA-bindende Proteine vorhanden waren. In unmittelbarer Nähe der Rekombinationsstellen konnten kurze DNA-Sequenzen identifiziert werden, die mit der postulierten IHF-Konsensussequenz **WATCAANNNTTR** (W=dA oder dT; R=dA oder dG; N=jedes Nukleotid) übereinstimmten. Die erste IHF-Sequenz AATCAATAAGTTA liegt „stromabwärts“ von *attL*. Eine zweite IHF-Sequenz AATCAAATGGTTA ist „stromaufwärts“ und die dritte Sequenz AATCAAGTAGTTA ist „stromabwärts“ von *attR-1* lokalisiert. Auf der genomischen Insel befindet sich eine vierte Sequenz AATCAATTGCTAA, die an einer Position eine Abweichung zur IHF-Konsensussequenz aufweist. Anstelle des postulierten dT, befindet sich ein dA. Außerhalb der LpcGI-2 Nukleotidsequenz wurde, „stromabwärts“ von *attR-2*, eine fünfte IHF-Sequenz AATCAATAAGTTA identifiziert (Abb. 19B).

Analog zur genomischen Insel Trb-1, sollte auch LpcGI-2 hinsichtlich möglicher episomaler Formen untersucht werden. Die Charakterisierung erfolgte zunächst über PCR mit chromosomaler DNA (200 ng/μl) als Template. Die DNA-Fragmente wurden in 35-Zyklen amplifiziert. Für die PCR-Produkte 1/5, 2/6, 3/5 und 4/6 wurden 40-Zyklen benötigt. Um exakte Aussagen über mögliche Rekombinationsmechanismen für die Exzision und Integration treffen zu können, wurden die PCR-Produkte der zirkulären Formen A (2/3), B (1/5), und AB (3/5) und der „intakten“ tRNA Gene (1/4 und 4/6) bzw. der *attB* Sequenz (2/6) sequenziert. Die PCR-Produkte wurden zunächst in den Vektor pGEM-T Easy kloniert und anschließend sequenziert (Abb. 19E und 20). Für jedes der PCR-Produkte wurden mehrere rekombinante Plasmide aus verschiedenen *E. coli* Klonen isoliert und sequenziert. Für die Sequenzierungs-PCR wurden die MCS-Primer M13-U bzw. M13-R verwendet. Zum Nachweis der zirkulären episomalen und chromosomalen Formen der genomischen Insel wurden die Oligonukleotidprimer spezifisch kombiniert (Abb. 19D).

Mit dem Primerpaar 2/3 (LpcGI-2-2R/LpcGI-2-3U) konnte gezeigt werden, dass das Element A (*lpc1833-lpc1888*) von LpcGI-2, als zirkuläre episomale Form A vorliegen kann (Abb. 19C, Spur 1 und 19D). Dieses Ergebnis konnte auch durch die Sequenzierung des PCR-Produktes 2/3 bestätigt werden (Abb. 19E). Die Sequenzen der klonierten PCR-Produkte waren bei den sechs untersuchten Klonen identisch. Die Ergebnisse der Sequenzierung zeigen, dass es durch die Exzision des Elements, zu einer Rekombination von *attL* und *attR-1* kommt, wodurch in der episomalen Form A die *attP* Rekombinationsstelle generiert wird (Abb. 19E). In der Sequenz „stromaufwärts“ von *attP* wurden mehrere kurze DNA-Sequenzwiederholungen der Form NTTTN bestimmt. Zusätzlich ist „stromabwärts“ von *attP* eine kurze „Inverted Repeat“ (IR) Sequenz 5'-AAAAGTC-N₇-GACTTTTT-3'codiert. Durch die Bildung der episomalen Form A, konnte mit dem Primerpaar 1/4 (LpcGI-2-1U/LpcGI-2-4R) das „intakte“ tRNA^{Met} Gen amplifiziert werden (Abb. 19C, Spur 2; und 19D). Bei der Exzision des Elements A verbleibt im bakteriellen Chromosom die Rekombinationsstelle *attB* (Abb. 20A). Die Sequenzierung des PCR-Produktes 1/4 zeigte zudem, dass es bei der Exzision und Bildung der episomalen Form A, zu Abweichungen, bei der im Chromosom verbleibenden Nukleotidsequenz, kommen kann. Bei sechs von sieben sequenzierten Klonen wurde anstelle der erwarteten Rekombinationsstelle *attB*, die Sequenz von *attL* und eine variable Basenanzahl der nachfolgenden Nukleotidsequenz von LpcGI-2-A identifiziert. An diese Sequenz schließt sich die Nukleotidsequenz des Elements A an (Abb. 20B). Auch für das Element B (*lpc2136-lpc2121*) konnte mit dem Primerpaar 1/5 (LpcGI-2-1U/LpcGI-2-5R) eine zirkuläre episomale Form nachgewiesen werden (Abb. 19C, Spur 5). Wie die Ergebnisse der Sequenzierung zeigen, entsteht die episomale Form B durch die Rekombination von *attR-1* und *attR-2* und besitzt die Rekombinationsstelle *attP'* (Abb. 19E). Die Ergebnisse der Sequenzierung lassen erkennen, dass die *attP'*-Sequenz an zwei Positionen variieren kann. Die Rekombinationsstelle *attP'*, kann an den Positionen 23 und 29 jeweils ein dT besitzen und ist somit mit *attR-1* identisch. Ebenso kann in der *attP'*-Sequenz, an den genannten Positionen, das dT jeweils durch ein dC ersetzt sein, wodurch die Sequenz mit der von *attR-2* übereinstimmt (Abb. 19B und E). Insgesamt wurden hier sechs Klone sequenziert, von denen jeweils drei an den genannten Positionen von *attP'* ein dT und drei der Klone ein dC aufwiesen. In beiden Fällen stimmte jedoch die Nukleotidsequenz „stromaufwärts“ von *attP'* mit der Sequenz „stromaufwärts“ von *attR-2* überein. Auch die DNA-Sequenz „stromabwärts“ von *attP'*, ist bei beiden Variationen immer mit der Sequenz „stromabwärts“ von *attR-1* identisch. Ähnlich zu *attP* wurden auch in der Nähe von *attP'* mehrere kurze Sequenzwiederholungen, der Form NTTTN, gefunden. Ebenso wurde auch „stromabwärts“

von *attP*⁺, ein „Inverted Repeat“ 5'-TAAAAT-N₃₀-ATTTTA-3' identifiziert (Abb. 19 E). Die episomale Form B konnte auch indirekt mit der Primerkombination 2/6 (Lpc-GI3-2R/Lpc-GI3-6U) belegt werden (Abb. 19C, Spur 6). Mit dem PCR-Produkt 2/6 wurde auch die *attB*⁺-Sequenz amplifiziert. Nach der Exzision des Elements B (*lpc2136-lpc2121*) bleibt im Chromosom *attB*⁺ zurück. Die DNA-Sequenzierung zeigte eine Übereinstimmung der Sequenzen von *attB*⁺ und *attR*-2 (Abb. 20C). Alle der sechs sequenzierten Klone bzw. rekombinanten Plasmide codierten in der *attB*⁺-Sequenz, an den oben genannten Positionen, für ein dC, anstelle eines dT.

Nachdem für die Elemente A und B jeweils eine episomale zirkuläre Form detektiert werden konnte, stellte sich die Frage, in wie weit dies auch für die gesamte genomische Insel LpcGI-2 der Fall ist. Mittels PCR konnte auch hier erstmals gezeigt werden, dass die gesamte genomische Insel LpcGI-2 bzw. das Element AB (*lpc1833* bis *lpc2121*) in einer zirkulärer episomale Form vorliegen kann (Abb. 19C, Spur 9). Für die Detektion der episomalen Form AB wurde das Primerpaar 3/5 (Lpc-GI3-3U/Lpc-GI3-5R) verwendet. Nach der Exzision der gesamten Insel, verfügte die episomalen Form AB über die Rekombinationsstelle *attP*⁺, welche durch die Rekombination von *attL* und *attR*-2 entstanden ist. Aus den Daten der Sequenzierung des PCR-Produktes 3/5 ließ sich erkennen, dass die *attP*⁺-Sequenz ebenfalls an den Positionen 23 und 29, entweder jeweils für ein dT oder ein dC codieren kann. Von den zwei sequenzierten Klonen, wurde beim erste Klon, in *attP*⁺ jeweils ein dT und beim zweiten, an der besagten Position, ein dC identifiziert. Befindet sich an den genannten Positionen jeweils ein dT, dann ist *attP*⁺ mit der Sequenz von *attL* identisch. Durch ein dC, an den betreffenden Stellen, besteht eine Übereinstimmung zwischen den Nukleotidsequenzen von *attP*⁺ und *attR*-2 (Abb. 19B und E). Bei beiden hier beschriebenen Variationen, stimmte die DNA-Sequenz „stromaufwärts“ von *attP*⁺, mit der Sequenz „stromaufwärts“ von *attR*-2 überein. Ebenso ist in beiden Fällen, die Sequenz „stromabwärts“ von *attP*⁺, identisch mit der Sequenz, die auch „stromabwärts“ von *attL* liegt. Bei einer genaueren Auswertung der Sequenzdaten wurden, „stromaufwärts“ von *attP*⁺ die bereits beschriebenen DNA-Sequenzwiederholungen NTTTN identifiziert. Die IR-Sequenz die „stromabwärts“ von *attP*⁺ lokalisiert ist, stimmt mit der IR-Sequenz „stromabwärts“ von *attP* überein. Bei einer Exzision der gesamten genomischen Insel konnte das „intakte“ tRNA^{Met} Gen mit der Primerkombination 4/6 (LpcGI-2-4R/LpcGI-2-6U) amplifiziert werden (Abb. 19C, Spur 10). Aus den Daten der Sequenzierung ließ sich erkennen, dass die *attB*⁺ Sequenz, die nach der Exzision im Genom zurückbleibt, sowohl zur Sequenz von *attL*, als auch zur *attR*-2 Sequenz identisch sein kann (Abb. 20C). Bei zwei von sechs sequenzierten Klonen stimmte *attB*⁺ mit

attL überein. Vier der Klone codierten in der *attB*⁺-Sequenz an den entscheidenden Positionen für ein dC und waren somit zu *attR*-2 identisch.

Die integrierten und chromosomalen Formen der Insel wurde mit den Primerpaaren 1/2 (LpcGI-2-1U/LpcGI-2-2R), 3/4 (LpcGI-2-3U/LpcGI-2-4R) und 5/6 (LpcGI-2-5R/LpcGI-2-6U) nachgewiesen (Abb. 19 C, Spur 3, 4, 7, 8, 11, 12). Die PCR-Analyse ließ erkennen, dass LpcGI-2-A und LpcGI-2-B auch unabhängig voneinander in einer integrierten Form vorliegen können (Abb. 19C, vgl. Spur 3, 4 und 7, 8). Zudem zeigen die Ergebnisse aus der PCR und DNA-Sequenzierung deutlich, dass die genomische Insel LpcGI-2 sowohl in verschiedenen zirkulären episomalen Formen, als auch in unterschiedlichen integrierten chromosomalen Formen existieren kann. Für LpcGI-2 wurden die drei möglichen episomalen Formen A, B und AB nachgewiesen. Des Weiteren lässt sich anhand der benötigten PCR-Zyklen erkennen, dass die Bildung der episomale Form A und somit auch die Exzision des Elements A häufiger erfolgt, als dies für die Formen B und AB von LpcGI-2 der Fall ist. Der Nachweis der episomalen Formen B und AB war mittels PCR erst mit 40-Zyklen möglich (Abb. 19C, Spur 5 und 9). Für die Detektion der episomalen Form A waren hingegen 35-Zyklen ausreichend (Abb. 19C, Spur 1).

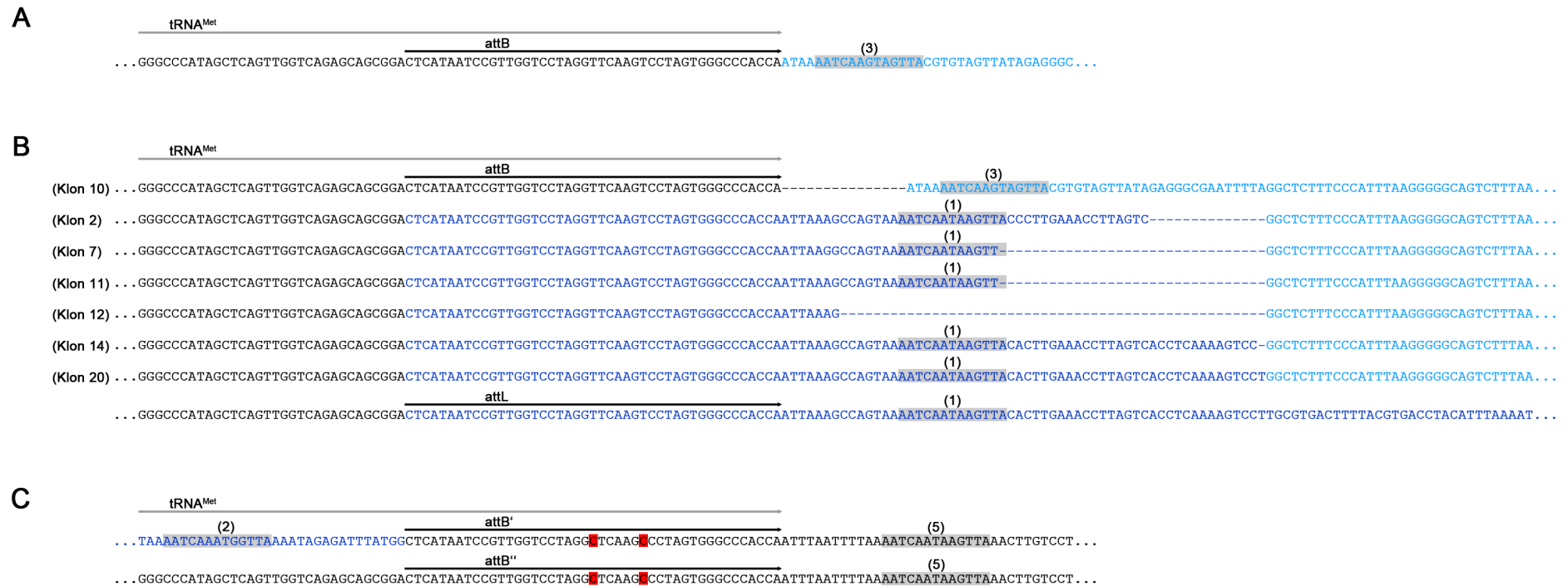


Abb. 20: (A) Nukleotidsequenz der Rekombinationsstelle *attB* (schwarzer Pfeil), die nach der Exzision des Elements A (*lpc1833-lpc1888*) der genomischen Insel LpcGI-2 in Chromosom verbleibt. (B) Ergebnisse der Sequenzierung des PCR-Produktes 1/4. Dargestellt ist die erwartete Nukleotidsequenz von *attB* (Klon 10) nach der Exzision des Elements A und die chromosomale Form von LpcGI-2 mit der *attL* (schwarzer Pfeil) Sequenz. Bei den Klonen 2, 7, 11, 12, 14 und 20 wurden nach der Exzision und Bildung der episomalen Form A, Abweichungen von der erwarteten *attB* Sequenz gefunden. (C) Nukleotidsequenzen der „attachment sites“ *attB'* und *attB''* (schwarzer Pfeil). Nach der Exzision des Elements B (*lpc2136-lpc2121*) verbleibt im Chromosom von *L. pneumophila* Corby die Rekombinationsstelle *attB'*. Bei der Exzision der gesamten genomischen Insel LpcGI-2 (*lpc1833-lpc2121*) und der Bildung der episomalen Form AB verbleibt im bakteriellen Chromosom ein „intaktes“ *tRNA^{Met}* Gen mit der *attB''* Sequenz. Die DNA-Sequenz der genomischen Insel LpcGI-2 ist in blauer (Element A) bzw. hellblauer (Element B) und chromosomale DNA ist in schwarzer Schrift dargestellt. Abweichungen in der Basensequenz von *attB'* und *attB''* zu *attB* bzw. *attL* sind mit rot markiert. Die Zahlen 1, 2, 3 und 5 kennzeichnen die IHF-Konsensussequenz WATCAANNNTTR (W=dA oder dT; R=dA oder dG; N=jedes Nukleotid), die mit grau hinterlegt ist.

3.2.2 Die Funktion der Integrasen bei der Bildung der episomalen Formen von LpcGI-2

Die genomische Insel LpcGI-2 von *L. pneumophila* Corby codiert für drei putative Integrasen. Auf dem größeren Element A (*lpc1833* bis *lpc1888*), von LpcGI-2, codieren jeweils die Gene *lpc1833* und *lpc1884* für ein putatives Integrase-Protein (Abb. 19A). Die dritte putative Integrase (*lpc2123*) ist auf dem kleineren Element B bzw. der Region IV (*lpc2136* bis *lpc2121*) von LpcGI-2 lokalisiert (Abb. 19A). Ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit war die Frage nach der Bedeutung der Integrase, für die ortsspezifische Exzision und Integration der genomischen Inseln. Für Trb-1 konnte bereits gezeigt werden, dass die auf der Insel codierte Integrase (*lpc2818*), eine wichtige Rolle bei der Exzision und Bildung der episomalen Form besitzt (siehe Ergebnisse, 3.1.1).

Analog zu Trb-1, sollte durch die Generierung von Integrase-Deletionsmutanten untersucht werden, inwieweit die auf LpcGI-2 codierten Integrasen funktionell sind und welches der Enzyme jeweils an der Bildung der episomalen Formen A, B und AB beteiligt ist. Zur Herstellung der Deletionsmutanten, von *lpc1833*, *lpc1884* bzw. *lpc2123*, diente jeweils ein DNA-Konstrukt, bestehend aus einer Km^R-Kassette und den entsprechenden flankierenden Sequenzen (siehe Methoden, 2.2.2.20). Das jeweilige DNA-Konstrukt wurde über natürliche Transformation in *Lp* Corby transformiert (siehe Methoden, 2.2.3.4). Mit spezifischen Primern (siehe Material 2.1.5, Tab. 7) wurden die Transformanten auf die eingebaute Km^R-Kassette und die vollständige Deletion des gewünschten Gens untersucht. Zum Nachweis der Deletion dienten für die Mutanten $\Delta lpc1833$, $\Delta lpc1884$ und $\Delta lpc2123$, die entsprechenden Primerpaare Int-1833-Uin/Int-1833-Rout, Int-1884-Uin/Int-1884-Rout und Int-2123-Uout/Int-2123-Rin (siehe Material 2.1.5, Tab. 7). Die jeweiligen Primerpaare wurden so gewählt, dass nur beim „Wildtyp“ *Lp* Corby ein PCR-Produkt amplifiziert werden sollte. Die Ergebnisse der nachfolgenden Charakterisierung der Integrase Mutanten zeigen hier immer nur die Daten für folgende Klone, $\Delta lpc1833$ (Klon 18), $\Delta lpc1884$ (Klon 8) und $\Delta lpc2123$ (Klon 1). Die Integrase Mutanten wurden hinsichtlich der Bildung der episomalen Formen A, B und AB und der chromosomalen Formen untersucht. Die Charakterisierung erfolgte zunächst über PCR mit den unter 3.1.1 (siehe Ergebnisse) angegebenen Primerkombinationen (Abb. 19C und D) und PCR-Zyklen (35 bzw. 40). Als Template diente chromosomale DNA (200 ng/μl).

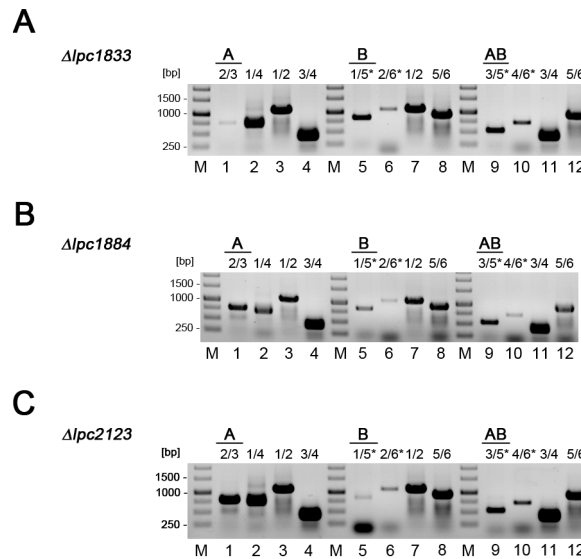


Abb. 21: Ergebnisse der PCR Analyse der genomischen Insel LpcGI-2 bei den Integrase Mutanten. (A) *L. pneumophila* Corby $\Delta lpc1833$ ($lpc1833::Km^R$), (B) *L. pneumophila* Corby $\Delta lpc1884$ ($lpc1884::Km^R$) und (C) *L. pneumophila* Corby $\Delta lpc2123$ ($lpc2123::Km^R$). Zum Nachweis der episomalen Formen A, B und AB diente die Primerpaare 2/3 (Spur 1), 1/5 (Spur 5) und 3/5 (Spur 9). Das intakte $tRNA^{Met}$ Gen wurde mit dem Primerpaar 1/4 (Spur 2) und 4/6 (Spur 10) und $attB'$ mit 2/6 (Spur 6) detektiert. Die chromosomale Form der genomischen Insel wurde mit den Primerkombinationen 1/2 (Spur 3 und 7), 3/4 (Spur 4 und 11) und 5/6 (Spur 8 und 12) nachgewiesen. Die PCR-Produkte wurden in 35 Zyklen bzw. 40 Zyklen (*) amplifiziert. Als Template diente chromosomale DNA (200 ng/μl). Die Primer sind wie folgt benannt: 1=LpcGI-2-1U; 2=LpcGI-2-2R; 3=LpcGI-2-3U; 4=LpcGI-2-4R; 5=LpcGI-2-5R; 6=LpcGI-2-6U.

Wie die Ergebnisse zeigten, war die zirkuläre Form A (2/3) bei der Integrase Mutante $\Delta lpc1833$ über PCR, nur durch eine sehr schwache DNA-Bande detektierbar (Abb. 21A, Spur 1). Hingegen konnten bei dieser Mutante sowohl die episomalen Formen B (1/5), als auch AB (3/5) nachgewiesen werden (Abb. 21A, Spur 5 und 9). Bei den Integrase Mutanten $\Delta lpc1884$ (Abb. 21B, Spur 1, 5 und 9) und $\Delta lpc2123$ (Abb. 21C, Spur 1, 5 und 9) lagen die episomalen Formen A, B und AB der genomischen Insel LpcGI-2 vor. Ähnlich zum „Wildtyp“ *Lp* Corby, waren bei den drei Integrase Mutanten die integrierte chromosomale Form der gesamten genomischen Insel LpcGI-2 bzw. des Elements AB (3/4 und 5/6) und auch die chromosomale Form der Elemente A (1/2 und 3/4) und B (1/2 und 5/6) detektierbar (Abb. 21, Spur 3, 4, 7, 8, 11 und 12). Bei einer Exzision der Elemente A und AB, war erwartungsgemäß das „intakte“ $tRNA^{Met}$ Gen (1/4 und 4/6) sowohl bei $\Delta lpc1884$ (Abb. 21B, Spur 2, 6 und 10), als auch bei $\Delta lpc2123$ (Abb. 21C, Spur 2, 6 und 10) vorhanden. Ebenfalls wurde bei beiden Mutanten, im Falle einer Exzision des Elements B, die $attB'$ Rekombinationsstelle (2/6) detektiert. Überraschenderweise wurden bei der Mutante $\Delta lpc1833$, trotz der kaum nachweisbaren episomalen Form A, mit dem Primerpaar 1/4 ein intaktes $tRNA^{Met}$ Gen detektiert (Abb. 21A, Spur 2). Die Exzision der Elemente B und AB, konnte durch den Nachweis der $attB'$

Rekombinationsstelle (2/6) und des „intakten“ tRNA Gens (4/6), auch für $\Delta lpc1833$ gezeigt werden. Der Phänotyp der $\Delta lpc1833$ Mutante konnte, durch eine zweite unabhängig generierte Mutante, bestätigt werden. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der PCR, dass die Integrase Lpc1833 vermutlich an der Bildung der episomalen Form A von LpcGI-2 beteiligt ist. Für die ebenfalls auf der genomischen Insel codierten Integrasen Lpc1884 und Lpc2123, konnte über PCR kein Unterschied zum „Wildtyp“ *Lp Corby* festgestellt werden.

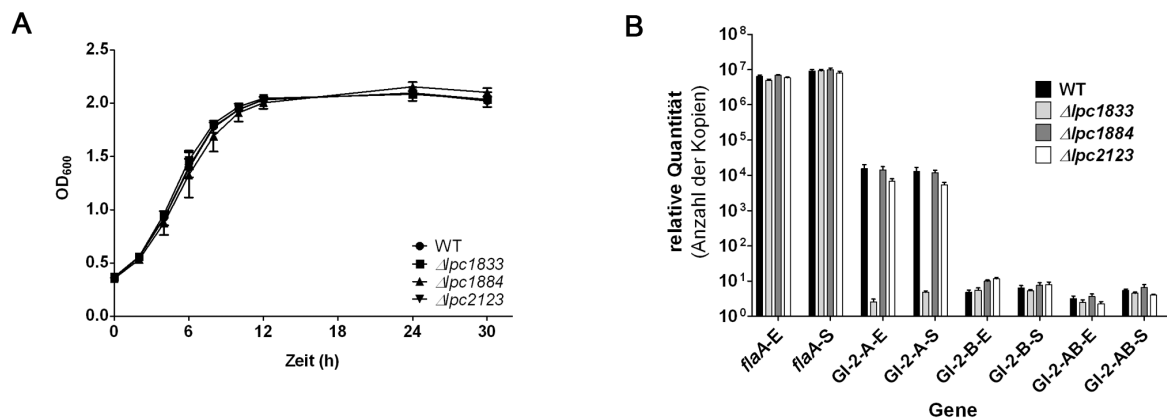


Abb. 22: (A) Wachstum von *L. pneumophila* Corby „Wildtyp“ und den Deletionsmutanten $\Delta lpc1833$, $\Delta lpc1884$ und $\Delta lpc2123$ in YEB-Medium bei 37°C. (B) Relative Quantifizierung der episomalen Formen von LpcGI-2 (GI_{3A}, GI_{3B}, GI_{3AB}) beim „Wildtyp“ und den Integrase Mutanten $\Delta lpc1833$, $\Delta lpc1884$ und $\Delta lpc2123$. Als Template diente chromosomale DNA aus der exponentiellen (E) und stationären (S) Phase. Die Messung der amplifizierten dsDNA erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes „Sybr Green“ am Mx3000P (Stratagene). Die episomale Form A wurde mit dem Primerpaar RT-LpcGI-2-2R/RT-LpcGI-2-3U, die episomale Form B mit RT-LpcGI-2-1U/RT-LpcGI-2-5R und die episomale Form AB mit RT-LpcGI-2-3U/RT-LpcGI-2-5R nachgewiesen. Als chromosomales Kontrollgen wurde *flaA* (*lpc0756*) verwendet. Die relative Anzahl der der Kopien von *flaA* und der episomalen Formen von LpcGI-2 wurde in Abhängigkeit einer Standardkurve mit der MxPro Software (Stratagene) berechnet.

Die genomischen Insel LpcGI-2 wurde bei *L. pneumophila* Corby und den Integrase Mutanten $\Delta lpc1833$, $\Delta lpc1884$ und $\Delta lpc2123$ zunächst mittels PCR charakterisiert (Abb. 19C und Abb. 21). Im Anschluss sollte, analog zu Trb-1, eine Quantifizierung der zirkulären episomalen Formen mittels Real-time PCR (qPCR) erfolgen. Die relative Quantifizierung der episomalen Formen A, B und AB von LpcGI-2 wurde, wie bei Trb-1, ebenfalls in Abhängigkeit des chromosomalen Gens *flaA* (*lpc0756*) bestimmt. Als Template diente chromosomale DNA, die jeweils aus der exponentiellen (E; OD₆₀₀≈1,0; 4h) und stationären (S; OD₆₀₀≈2,1; 24h) Phase aus den Bakterien isoliert wurde (Methoden, 2.2.2.2). Zuvor wurden die Integrase Mutanten auf einen möglichen Wachstumsdefekt in YEB-Medium, bei

37°C kontrolliert. Anhand der erstellten Wachstumskurve lässt sich erkennen, dass die *in vitro* Replikation von „Wildtyp“ und Integrase Mutanten nahezu identisch ist (Abb. 22A, Tab. 22). Für die qPCR wurde eine DNA-Konzentration von 50 ng/μl eingesetzt. Für die Detektion der drei möglichen episomalen Formen von LpcGI-2 wurden spezifische Oligonukleotide generiert. Mit der Primerkombination RT-LpcGI-2-2R/RT-LpcGI-2-3U wurde die episomale Form A nachgewiesen. Die episomale Form B wurde mit dem Primerpaar RT-LpcGI-2-1U/RT-LpcGI-2-5R und die episomale Form AB wurde über die Kombination der Primer RT-LpcGI-2-3U/RT-LpcGI-2-5R detektiert. Die Ergebnisse der qPCR konnten durch drei unabhängige Experimente, mit jeweils neu isolierter DNA, bestätigt werden.

Anhand der Daten aus der relativen Quantifizierung, wurde zunächst das jeweilige Verhältnis der episomalen Formen A, B und AB zum bakteriellen Chromosom bzw. dem chromosomalen Gen *flaA* ermittelt. Für die Bestimmung der Verhältnisse wurde der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten herangezogen (siehe Anhang, Tab. 24 und 25). Beim „Wildtyp“ *Lp* Corby betrug das Verhältnis der episomalen Form A von LpcGI-2 (LpcGI-2-A), zum chromosomalen Gen *flaA* in der exponentiellen Phase durchschnittlich $2,436 \times 10^{-3}:1$ und in der stationären Phase $1,283 \times 10^{-3}:1$ (Abb. 22B; Tab. 24). Für die Integrase Mutante $\Delta lpc1833$ konnte bereits mittels PCR gezeigt werden, dass LpcGI-2_A in den Bakterien nahezu nicht gebildet wird (Abb. 21A, Spur 1; Tab. 25). Dieses Ergebnis konnte durch die qPCR bestätigt werden. Das Verhältnis von LpcGI-2-A zum Kontrollgen, war bei $\Delta lpc1833$ in beiden untersuchten Wachstumsphasen ca. $5,2 \times 10^{-7}:1$ (Abb. 22B, Tab. 25). Bei den Integrase Mutanten $\Delta lpc1884$ und $\Delta lpc2123$ stimmte das Verhältnis von LpcGI-2-A zu *flaA*, mit demjenigen von *Lp* Corby überein. Für $\Delta lpc1884$ wurde in der exponentiellen Phase ein durchschnittlicher Wert von $2,177 \times 10^{-3}:1$ und in der stationären Phase ein Verhältnis von $1,434 \times 10^{-3}:1$ ermittelt (Abb. 22B, Tab. 25). Bei $\Delta lpc2123$ betrug das Verhältnis von LpcGI-2_A zu *flaA*, in der exponentiellen Phase $1,162 \times 10^{-3}:1$ und in der stationären Phase $6,778 \times 10^{-4}:1$ (Abb. 22B, Tab. 25). Für die zwei Integrase Mutanten $\Delta lpc1884$ und $\Delta lpc2123$ wurde im Vergleich zum „Wildtyp“, in der stationären Phase eine höhere Anzahl an Kopien von LpcGI-2-A errechnet. Mittels T-Test konnte für diese Unterschiede keine Signifikanz festgestellt werden (Tab. 25). Der Anteil der episomalen Formen B (LpcGI-2-B) und AB (LpcGI-2-AB), war im Vergleich zur episomalen Form A (LpcGI-2-A) sowohl beim „Wildtyp“, als auch bei den Integrase Mutanten sehr gering (Tab. 24 und 25). Das Verhältnis von LpcGI-2-B bzw. LpcGI-2-AB zum chromosomalen Gen *flaA*, betrug beim „Wildtyp“ in beiden Wachstumsphasen ca. $4 \times 10^{-7}:1$ bis $8 \times 10^{-7}:1$ (Abb. 22B, Tab. 24). Dieses Verhältnis entspricht in etwa dem Verhältnis von LpcGI-2-A zu *flaA* bei der Integrase Mutante $\Delta lpc1833$

(Abb. 22B, Tab. 25). Ähnliche Verhältnisse von LpcGI-2-B bzw. LpcGI-2-AB zu *flaA* wurden auch bei allen drei Integrase Mutanten bestimmt (Tab. 25). Neben der Frage nach dem Verhältnis der episomalen Formen von LpcGI-2 zu Chromosom, war auch das Verhältnis der episomalen Formen B und AB zur Form A beim „Wildtyp“ von Interesse. LpcGI-2-B lag in der exponentiellen Phase zu LpcGI-2-A in einem durchschnittlichen Verhältnis von $5,475 \times 10^{-4}:1$ vor und in der stationären Phase betrug das Verhältnis $9,465 \times 10^{-4}:1$ (Abb. 22B, Tab. 24). Das Verhältnis von LpcGI-2-AB zu LpcGI-2-A war ebenfalls in beiden Wachstumsphasen relativ ähnlich, $2,983 \times 10^{-4}:1$ (E-Phase) und $7,756 \times 10^{-4}:1$ (S-Phase). Mit Hilfe der relativen Quantifizierung konnte deutlich gezeigt werden, dass die Bildung der episomale Form A, in einer bakteriellen Kolonie, deutlich häufiger erfolgt, als die der episomalen Formen B und AB. Die Daten der qPCR bestätigen die Ergebnisse der PCR. Im Vergleich zur episomalen Form A, für deren Detektion mittels PCR bereits 35 Zyklen ausreichen waren, war bei den Formen B und AB selbst mit 40 Zyklen nur eine schwache DNA-Bande sichtbar (Abb. 19C und Abb. 21). Zusätzlich konnte auch gezeigt werden, dass LpcGI-2-A im Vergleich zu LpcGI-2-B und LpcGI-2-AB in einer *Legionella* Kolonie in einer deutlich höheren Kopienzahl vorlag. Letztendlich waren aber die relative Anzahl der Kopien von LpcGI-2-A, deutlich unter dem Niveau eines chromosomalen Gens.

3.2.3 Der Einfluss von Integrase und PilT auf die Konjugation

Die Region I (*lpc1857* bis *lpc1880*) der genomischen Insel LpcGI-2 von *L. pneumophila* Corby codiert für ein putatives Typ IV Sekretionssystem (Abb. 19A). Innerhalb dieser Region ist eine *Legionella vir* Region (*lvrABC*; *lpc1857* bis *lpc1860*) lokalisiert. Die Gene der Region I codieren für T4SS Komponenten, darunter ein VirB4-ähnliches Protein (*lpc1874*), ein TraG-ähnliches Membranprotein (*lpc1877*) und der konjugative Faktor TraD (*lpc1880*). Zudem wurden zwei *pil*-Gene identifiziert, die für ein PilL-ähnliches Protein (*lpc1861*) bzw. PilT (*lpc1876*) codieren. Die ATPase PilT wird für den Zusammenbau und Abbau des Pilus benötigt.

In dieser Arbeit sollte mit Hilfe von Konjugationsexperimenten untersucht werden, inwiefern es sich beim putativen Typ IV Sekretionssystem der Region I von LpcGI-2, um ein funktionelles Konjugationssystem handelt. Als Donor fungierten der „wildtypische“ Stamm *Lp* Corby WT*, die Integrase Mutanten $\Delta lpc1833$ und $\Delta lpc2123$ und die Deletionsmutante $\Delta pilT$. Beim „wildtypischen“ Stamm WT* wurde zur Markierung der genomischen Insel eine

Km^R-Kassette zwischen die Gene *lpc1856* und *lpc1857* kloniert. Bei *Lp* Corby $\Delta pilT$ wurde das Gen *lpc1876* durch den Einbau einer Km^R-Kassette deletiert. Die Herstellung der DNA-Konstrukte, für die Deletionsmutante bzw. die Markierung von LpcGI-2, erfolgte wie bei den zuvor generierten Deletionsmutanten (siehe Methoden, 2.2.2.20 und 2.2.3.4). Der Einbau der Km^R-Kassette wurde bei *Lp* Corby WT* mit dem Primerpaar GI-2-KmR-Rout und KmR-XbaI-U nachgewiesen. Die Mutante $\Delta pilT$ wurde mittels spezifischer Primerpaare auf eine vollständige Deletion von *lpc1876* (*pilT-lpc1876-Uin/pilT-lpc1876-Rout*) und auf den Einbau Km^R-Kassette (*pilT-1876-Rout/KmR-XbaI-U*) kontrolliert. In der Konjugation fungierte der Stamm *L. pneumophila* Philadelphia-I JR32 (Sm^R) als Rezipient. Die Konjugation erfolgte in Anwesenheit von DNase I auf BCYE Agar. Zur Selektion der Transkonjuganten wurden Kanamycin- und Streptomycin-haltige BCYE Agarplatten verwendet (siehe Methoden, 2.2.3.5). Für die Berechnung der Transkonjugationsrate wurde die Anzahl der Transkonjuganten durch die Anzahl des Donors dividiert.

Die Ergebnisse der Konjugation zeigten, dass die genomische Insel LpcGI-2 vom wildtypischen *Lp* Corby Stamm WT*, in *Lp* JR32, mit einer Rate von $7,25 \times 10^{-3}$ konjugiert wurde (Abb. 23). Bei der Mutante $\Delta pilT$ betrug die Konjugationsrate durchschnittlich $4,885 \times 10^{-5}$ und bei der Integrase Mutante $\Delta lpc1833$ lag die Rate bei $4,955 \times 10^{-5}$ (Abb. 23). Somit war die Transkonjugationsrate bei $\Delta pilT$ um einen Faktor von ca. 148 und bei $\Delta lpc1833$ um einen Faktor von ca. 146 vermindert. Die Transkonjugationsraten beider Mutanten lagen damit deutlich unterhalb der Transkonjugationsrate des wildtypischen Stamms. Für die Konjugation mit dem Donor $\Delta lpc2123$ wurde keine Transkonjugationsrate bestimmt. Die Konjugation mit dieser Integrase Mutante wurde zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt und diente lediglich zur Kontrolle. Dabei sollte untersucht werden, inwieweit das Element B von LpcGI-2 auch unabhängig von der gesamten Insel (AB) konjugiert werden kann. Da diese Integrase Mutante anstelle des Gens *lpc2123* eine Km^R-Kassette besaß, erfolgte hier die Selektion der Transkonjuganten hauptsächlich auf die Elemente B und AB.

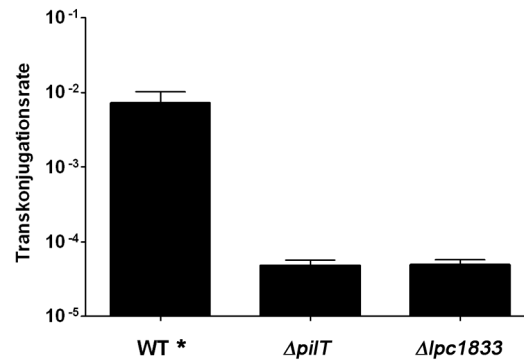


Abb. 23: Graphische Darstellung der Transkonjugationsraten von LpcGI-2. Als Donor dienten *Lp* Corby WT* bzw. die Deletionsmutanten $\Delta pilT$ und $\Delta lpc1833$. Als Rezipient wurde *Lp* Phil-1 JR32 verwendet. Die Konjugation erfolgte unter Zugabe von DNase I, bei 30°C auf BCYE Agarplatten. Zur Selektion der Transkonjuganten dienten BCYE Agarplatten mit Kanamycin und Streptomycin. Die Konjugationsrate wurde bestimmt durch: Anzahl Transkonjuganten/Anzahl Donor. Die Transkonjugationsrate betrug bei *Lp* Corby WT* $7,25 \times 10^{-3}$, bei $\Delta pilT$ $4,885 \times 10^{-5}$ und bei der Integrase Mutante $\Delta lpc1833$ $4,955 \times 10^{-5}$. Bei den hier angegebenen Werten handelt es sich jeweils um den Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten.

Die Transkonjuganten (TK) wurden mittels PCR (35 und 40 Zyklen) charakterisiert. Von Interesse war vor allem die Frage, ob auch in den Transkonjuganten die episomalen Formen A, B und AB von LpcGI-2 nachweisbar waren. Ebenso sollten die TK auf eine ortsspezifische Integration der genomischen Insel in das tRNA^{Met} Gen (*lpg2362*) kontrolliert werden (Abb. 25). Aus jedem Konjugationsansatz wurden jeweils 30 Klone auf das Gen *lpg0402* (*legA9*) von *Lp* Phil-1 untersucht. Damit sollte ausgeschlossen werden, dass es sich bei den Klonen um den Donor handelte (Abb. 24A). Zusätzlich wurden die Transkonjuganten hinsichtlich der konjugierten genomischen Insel LpcGI-2 charakterisiert. Die jeweils 30 Transkonjuganten wurden zunächst auf das spezifische LpcGI-2 Gen *lpc1850* untersucht (Abb. 24A). Die Kontrolle auf die spezifischen LpcGI-2 Gene *lpc1833*, *lpc1884* und *lpc2123*, lieferte Aufschluss darüber, ob die gesamte genomische Insel (AB; *lpc1833* bis *lpc2121*) bzw. nur das Element A (*lpc1833* bis *lpc1888*) oder nur das Element B (*lpc2136* bis *lpc2121*) konjugiert wurde. In der PCR wurden jeweils 10 Klone getestet. Diente der wildtypische Stamm *Lp* Corby WT* als Donor, war bei allen untersuchten Transkonjuganten (TK_{WT*}) nur das Element A der genomischen Insel nachweisbar (Abb. 24A). Fungierten hingegen die Deletionsmutanten $\Delta pilT$, $\Delta lpc1833$ bzw. $\Delta lpc2123$ als Donor, war die gesamte Insel LpcGI-2 bei den TK nachweisbar (Abb. 24A). Dieses Ergebnis konnten zum einen durch die Detektion der episomalen Formen A, B und AB und zum anderen durch die Integration von LpcGI-2 in das Gen für die tRNA^{Met} (*lpg2362*) der Transkonjuganten, bestätigt werden (Abb. 24C und 25). Bei den Transkonjuganten TK_{WT*} konnte nur die episomale Form A

nachgewiesen werden (Abb. 24B). Durch die PCR (40 Zyklen) mit den Primerkombinationen 2/6⁺ und 3/4⁺ konnte gezeigt werden, dass dieser Teil der genomischen Insel auch ortsspezifisch in das tRNA^{Met} Gen der Transkonjuganten integriert werden kann (Abb. 24C). Die PCR mit dem Primerpaar 1/2 lieferte bei TK_{WT}* kein PCR-Produkt (Abb. 24C), was die Beobachtung bestätigte, dass nur das Element A konjugiert wurde. Bei den Transkonjuganten TK_{ΔpilT} und TK_{Δlpc2123} lagen hingegen alle drei möglichen episomalen Formen vor (Abb. 24B). Erwartungsgemäß, lag die genomische Insel bei den Transkonjuganten TK_{Δlpc1833} nur in den episomalen Formen B und AB vor (Abb. 24B). Transkonjuganten, die nur die episomale Form B von LpcGI-2 besaßen, wurden nicht identifiziert. Analog zu TK_{WT}* konnte auch für die Transkonjuganten TK_{ΔpilT}, TK_{Δlpc2123} und TK_{Δlpc1833} mit Hilfe der Primerpaare 2/6⁺ und 3/4⁺ eine ortsspezifische Integration für das Element A von LpcGI-2 gezeigt werden (Abb. 24C). Zusätzlich konnte für diese Transkonjuganten mit dem Primerpaar 5/6⁺ die chromosomale Form für die gesamte genomische Insel (AB) bzw. das Element B nachgewiesen werden (Abb. 24C). Die Integration der gesamten genomischen Insel LpcGI-2, in das tRNA^{Met} Gen der Transkonjuganten, wurde auch über das PCR-Produkt 1/2 bestätigt (Abb. 24C). Hier lieferte das Primerpaar nur dann ein PCR-Produkt, wenn das Element A und B gleichzeitig in das tRNA Gen integriert waren. Das Intakte tRNA^{Met} Gen wurde über die Primerkombination 4⁺/6⁺ bei allen Transkonjuganten, sowie dem Rezipienten *Lp* JR32 detektiert (Abb. 24C). Für den Nachweis der Integration von LpcGI-2 in das Genom der Transkonjuganten, wurden aus jedem Konjugationsansatz jeweils drei TK kontrolliert. Alle Ergebnisse der Konjugation sind in Tabelle 17 zusammengefasst. In diesem Experiment wurde zum ersten Mal gezeigt, dass die genomischen Insel LpcGI-2 in einen anderen *L. pneumophila* Stamm konjugiert werden kann. Die Ergebnisse zeigen zudem, dass sowohl die gesamte Insel LpcGI-2, als auch nur das Element A konjugiert wird. Nach der Konjugation kann die genomische Insel LpcGI-2 in den drei möglichen zirkulären episomalen Formen A, B und AB vorliegen oder ortsspezifisch in das Chromosom der Transkonjuganten integriert werden. Zudem geht aus den Transkonjugationsraten hervor, dass die Konjugation der genomischen Insel von der ATPase PilT und der Integrase *lpc1833* abhängig ist.

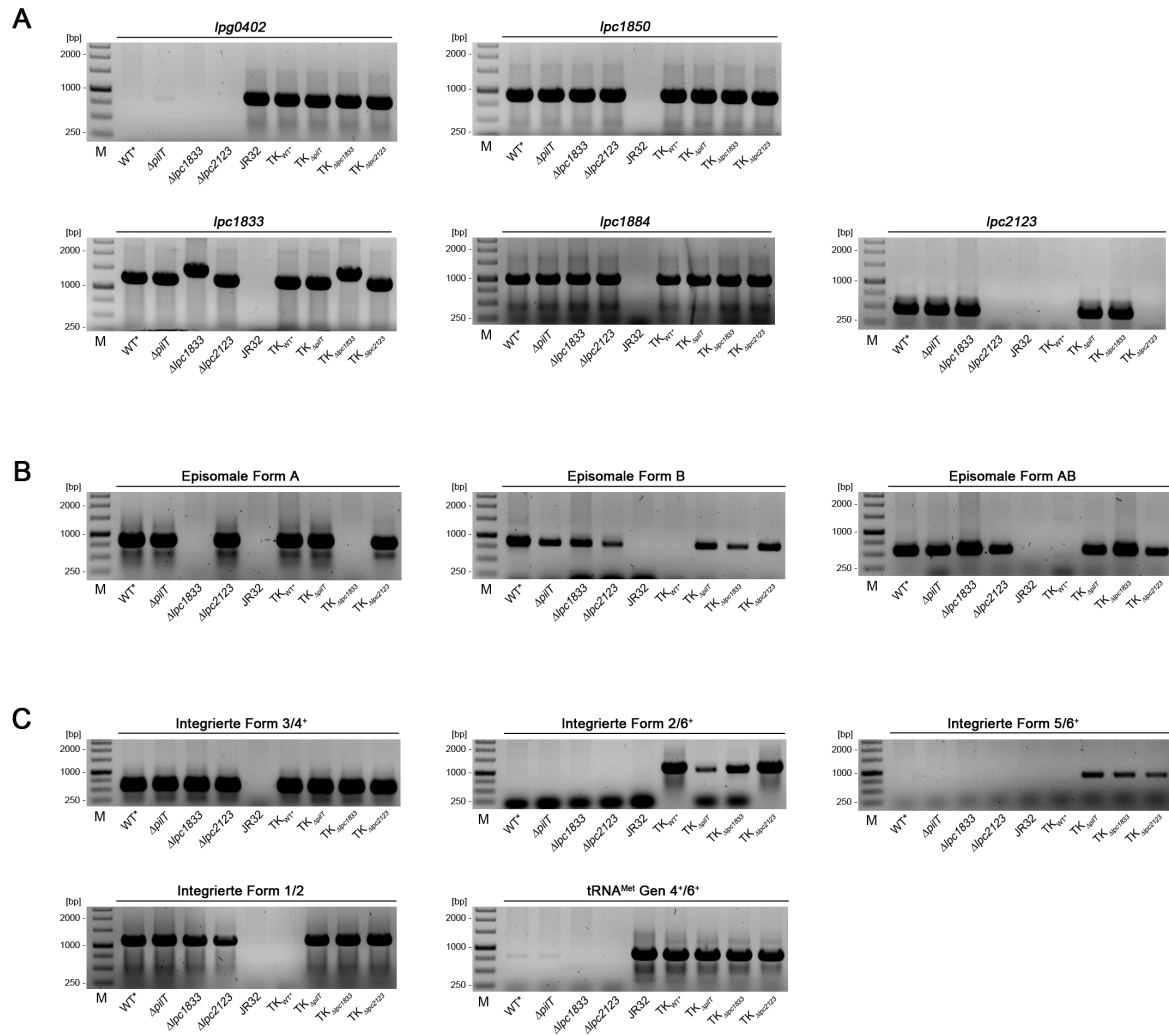


Abb. 24: PCR-Analyse der Transkonjuganten (TK) aus der Konjugation der genomischen Insel LpcGI-2 in *Lp* Phil-I JR32 (Rezipient). Als Donor dienten jeweils der Stamm *Lp* Corby WT* und die Mutanten $\Delta pilT$, $\Delta lpc1833$ und $\Delta lpc2123$. Zur Darstellung der Ergebnisse aus der PCR-Analyse, ist hier aus jedem Konjugationsansatz nur jeweils ein Klon gezeigt. Folgende TK sind hier gezeigt: TK_{WT*} (Klon 7), TK _{$\Delta pilT$} (Klon 18), TK _{$\Delta lpc1833$} (Klon 2) und TK _{$\Delta lpc2123$} (Klon 6). Die TK, der Rezipient und die Donorstämme wurden kontrolliert (A) auf das *Lp* Phil-1 Gen *lpg0402* (*lpg0402*-U/*lpg0402*-R), auf das spezifische LpcGI-2 Gen *lpc1850* (*lpc1850*-U/*lpc1850*-R) und auf die Konjugation der gesamten genomischen Insel (Element A und B; *lpc1833-lpc2121*) durch den Nachweis der Gene *lpc1833* (*lpc1833*-U/*lpc1833*-R), *lpc1884* (*lpc1884*-U/*lpc1884*-R) und *lpc2123* (*lpc2123*-U/*lpc2123*-R). (B) auf das Vorliegen der episomalen und zirkulären Form A (2/3), der Form B (1/5) und der Form AB (3/5) von LpcGI-2. (C) auf die Integration der genomischen Insel in das tRNA^{Met} Gen (*lpg2362*) der TK nach der Konjugation. Kontrolliert wurde auf die Integration des Elements A (3/4⁺ und 2/6⁺), des Elements B (2/6⁺ und 5/6⁺) und des gesamten Elements AB (3/4⁺ und 5/6⁺). Das Vorliegen der genomischen Insel in der Form AB wurde durch die Primerkombination 1/2 kontrolliert. Das intakte tRNA^{Met} Gen (*lpg2362*) wurde durch das Primerpaar 4⁺/6⁺ nachgewiesen. Die Zahlen 1, 2, 3, 4⁺, 5 und 6⁺ bezeichnen folgende Primer: 1=LpcGI-2-1U; 2=LpcGI-2-2R; 3= LpcGI-2-3U; 4⁺=trnM-*lpg2362*-R; 5= LpcGI-2-5R; 6⁺=trnM-*lpg2362*-U. Der Nachweis der Gene *lpg0402*, *lpc1850*, *lpc1833*, *lpc1884* und *lpc2123* erfolgte in 35 PCR-Zyklen. Zur Detektion der episomalen und integrierten Formen, sowie des intakten tRNA^{Met} Gens wurden 40 PCR-Zyklen benötigt.

Tab. 17: Zusammenfassung der Ergebnisse der Konjugation der genomischen Insel LpcGI-2 von *L. pneumophila* Corby in *L. pneumophila* Philadelphia-1 JR32.

Gen bzw. Primer	Donor				Rezipient		Transkonjuganten			
	LpC, WT*	$\Delta pilT$	$\Delta lpc1833$	$\Delta lpc2123$	<i>Lp</i> JR32	TK _{WT} *	TK _{$\Delta pilT$}	TK _{$\Delta lpc1833$}	TK _{$\Delta lpc2123$}	
<i>lpg0402</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	
<i>lpc1850</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	+	
<i>lpc1833</i>	+	+	-	+	-	+	+	-	+	
<i>lpc1884</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	+	
<i>lpc2123</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	-	
Episomale Formen von GI3										
A (2/3)	+	+	-	+	-	+	+	-	+	
B (1/5)	+	+	+	+	-	-	+	+	+	
AB (3/5)	+	+	+	+	-	-	+	+	+	
Chromosomale Formen von GI3										
2/6	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
2/6 ⁺	-	-	-	-	-	+	+	+	+	
3/4	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
3/4 ⁺	+	+	+	+	-	+	+	+	+	
5/6	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
5/6 ⁺	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
1/2	+	+	+	+	-	-	+	+	+	
4 ⁺ /6 ⁺	-	-	-	-	+	+	+	+	+	

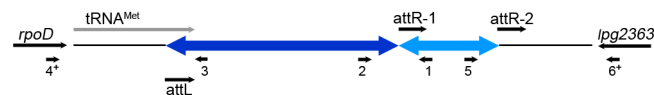


Abb. 25: Schematische Darstellung der genomischen Insel LpcGI-2, die bei den Transkonjuganten innerhalb des tRNA^{Met} Gens (*lpg2362*) integriert wird. Die Zahlen 1 bis 6 kennzeichnen die Orientierung und die Hybridisierungsstellen der Primer. 1=LpcGI-2-1U; 2=LpcGI-2-2R; 3=LpcGI-2-3U; 4⁺=trnM-lpg2362-R; 5=LpcGI-2-5R; 6⁺=trnM-lpg2362-U. Zum Nachweis der episomalen Formen A, B und AB diente die Primerpaare 2/3, 1/5 und 3/5. Das intakte tRNA^{Met} Gen wurde mit dem Primerpaar 4⁺/6⁺ detektiert. Die chromosomalen Formen der genomischen Insel wurde mit den Primerkombinationen 2/6⁺, 3/4⁺ und 5/6⁺ nachgewiesen.

3.2.4 Die Bedeutung von LpcGI-2 für die Virulenz von *L. pneumophila* Corby

Die LpcGI-2 spezifischen Integrase-Mutanten wurden bereits durch *in vitro* Experimente charakterisiert. Hier wurden die Mutanten in einem *in vivo* Experiment untersucht. Für die Integrase Mutante $\Delta lpc1833$ wurde bereits in den vorangegangenen Experimenten ein Phänotyp beschrieben. Mittels PCR und qPCR konnte gezeigt werden, dass die von *lpc1833* codierte Integrase bei der Bildung der episomalen Form A, der genomischen Insel LpcGI-2, funktionell beteiligt ist (siehe Ergebnisse; 3.2.2). Ebenso wurde für $\Delta lpc1833$ eine deutliche Verminderung der Transkonjugationsrate nachgewiesen (siehe Ergebnisse; 3.2.3).

In diesem *in vivo* Experiment sollte ein möglicher Einfluss der auf LpcGI-2 codierten Integrasen auf die Replikation von *L. pneumophila* Corby in *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 untersucht werden. Die Infektion erfolgte pro Stamm und pro Zeitpunkt in zwei Ansätzen und wie unter 2.2.4.1 (Methoden) beschrieben. Als Kontrolle diente der „Wildtyp“ *Lp* Corby (WT). Die Amöben wurden mit einer MOI von 0,01 infiziert. Die Auswertung des Infektionsexperimentes zeigte, dass alle drei Integrase Mutanten, $\Delta lpc1833$, $\Delta lpc1884$ und $\Delta lpc2123$ gleich gut in *A. castellanii* ATCC 30010 replizieren konnten. Ebenso infizierten die Integrase Mutanten, die hier verwendeten Amöben bei 37°C mit gleicher Effizienz, wie der „Wildtyp“ Stamm *L. pneumophila* Corby (Abb. 26).

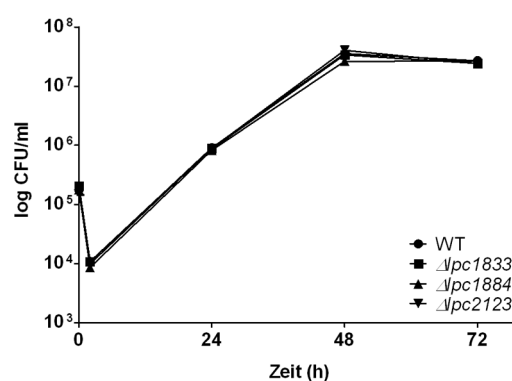


Abb. 26: Replikation von *L. pneumophila* Corby „Wildtyp“ und der Deletionsmutanten $\Delta lpc1833$, $\Delta lpc1884$ und $\Delta lpc2123$ in *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 bei 37°C, mit 5% CO₂.

3.2.5 Die Verbreitung der genomischen Insel LpcGI-2 in der Gattung *Legionella*

Die genomische Insel LpcGI-2 von *L. pneumophila* Corby ist innerhalb des tRNA^{Met} Gens integriert und umfasst die Gene *lpc1833* bis *lpc2121* (Abb. 19A; Abb. 27; siehe Anhang Tab. 26). In dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass die genomische Insel LpcGI-2, in einen anderen *L. pneumophila* Stamm, durch Konjugation übertragen werden kann. Es stellte sich die Frage, inwieweit LpcGI-2 im Genus *Legionella* verbreitet ist. Mittels *in silico* Analysen wurden die bereits sequenzierten und publizierten *Legionella* Genome nach Genen durchsucht, die eine Homologie zu den LpcGI-2 codierten Genen aufwiesen.

Im Genom von *L. pneumophila* Paris ist eine genomische Insel von ca. 130 kb codiert, die ebenfalls innerhalb eines tRNA^{Met} Gens lokalisiert ist (Cazalet et al., 2004). Ähnlich zu LpcGI-2 ist auch die genomische Insel von *Lp* Paris (LppGI-2) aus zwei genomischen Elementen zusammengesetzt. Das größere Element umfasst die Gene *lpp2311* bis *lpp2409* und das kleinere die Gene *lpp2410* bis *lpp2439* (Abb. 27). Zwischen den beiden Elementen ist eine *attR* Sequenz lokalisiert. Eine zweite *attR* Sequenz wurde zwischen den Genen *lpp2439* und *lpp2440* identifiziert. LppGI-2 codiert ebenfalls für ein putatives Typ IV Sekretionssystem (Abb. 27; Region I). Die Proteinsequenzen der Gene dieser Region I (*lpp2375* bis *lpp2398*), sind durchschnittlich zu ca. 97 % zu den Genen der Region I von LpcGI-2 ähnlich. Innerhalb der Region von LppGI-2 wurden Gene identifiziert, die für ähnliche Proteine codieren, wie die Genprodukte der Region II (*lpc1881* bis *lpc1888*) von LpcGI-2. Die Gene *lpp2399*, *lpp2400*, *lpp2404*, *lpp2406*, *lpp2408* und *lpp2409* codieren für Proteine mit unbekannter Funktion, die zu den LpcGI-2 Genprodukten der folgenden Gene identisch sind: *lpc1881* (90 %), *lpc1882* (97 %), *lpc1883* (90 %), *lpc1885* (86 %), *lpc1887* (94 %) und *lpc1888* (98 %). Die Sequenz der auf LppGI-2 lokalisierten Integrase (*lpp2404*) stimmt zu 92 % mit der LpcGI-2 Integrase (*lpc1884*) überein. Das Gen *lpp2407* codiert für ein putatives Antirestriktionsprotein, welches eine 90 %-ige Ähnlichkeit zu dem Genprodukt von *lpc1886* aufweist. Innerhalb der Region II, der genomischen Insel von *Lp* Paris, ist zudem noch eine Transposase (*lpp2402*) und ein Protein eines Cobalt-Nickel Resistenzsystems (*lpp2405*) lokalisiert. Beide Genprodukte besitzen keine Ähnlichkeit zu LpcGI-2 codierten Proteinen. Gene, die auf der genomischen Insel von *Lp* Corby in der Region III lokalisiert sind, konnten auch innerhalb der entsprechenden Region von LppGI-2 identifiziert werden (Abb. 27). Die auf LppGI-2 codierten Effluxproteine CadA (*lpp2370*), HelA (*lpp2371*), HelB (*lpp2372*) und HelC (*lpp2373*), stimmen in ihrer Sequenz durchschnittlich zu ca. 98 % mit

den auf LpcGI-2 codierten Effluxproteinen (*lpc1846-lpc1849*) überein. Das Genprodukt von *lpp2368*, das „stromaufwärts“ der *helABC* Region lokalisiert ist, besitzt eine Ähnlichkeit zu *lpc1841* (93 %). Hingegen sind die Gene *lpp2367* bis *lpp2319* von LppGI-2, zu Genen identisch, die bei *Lp* Corby auf der genomischen Insel LpcGI-1 lokalisiert sind. Interessanterweise sind die von *lpp2318* bis *lpp2312* codierten Proteine, hingegen wiederum zu ca. 94 bis 98 % zu den Genprodukten von *lpc1839* bis *lpc1833* ähnlich. Die Proteinsequenz der Integrase *lpc1833* (Region III) ist zur LppGI-2 codierten Integrase *lpp2312* (Region III) zu 98 % identisch. Innerhalb der Region IV von LppGI-2 wurden fünf Gene identifiziert, die auch innerhalb der Region IV von LpcGI-2 lokalisiert sind (Abb. 27). Die Gene *lpp2428*, *lpp2418* und *lpp2419* codieren für Proteine mit unbekannter Funktion und weisen in ihrer Proteinsequenz eine Ähnlichkeit von ca. 99 bis 100 % mit den Genprodukten von *lpc2131*, *lpc2130* und *lpc2129* auf. Für das Genprodukt von *lpp2424* bzw. *lpp2425* wurde nur eine geringe Übereinstimmung, zur Proteinsequenz von *lpc2125* (51 %) bzw. *lpc2124* (61 %) gefunden (Abb. 27).

Im Genom von *L. pneumophila* 130b ist die genomische Insel LGI-2 lokalisiert (Schroeder et al., 2010). LGI-2 ist Teil des ca. 150 kb großen genomischen Elements ROD, das die Gene *lpw21181* bis *lpw22871* umfasst und innerhalb des tRNA^{Arg} Gens integriert ist (Abb. 27). Ähnlich zu den bereits beschriebenen genomischen Inseln LpcGI-2 und LppGI-2, ist das 150 kb große Element ROD aus zwei genomischen Elementen zusammengesetzt (Abb. 27). Beide Elemente sind durch eine *attR* Rekombinationsstelle getrennt, die in der „nicht“-codierenden Sequenz zwischen den Genen *lpw22131* und *lpw22141* lokalisiert ist. Eine zweite *attR* Rekombinationsstelle wurde zwischen den Genen *lpw22871* und *lpw22881* identifiziert. Auf dem Element LGI-2, das die Gene *lpw21181* bis *lpw22131* umfasst, ist ein putatives Typ IV Sekretionssystem (T4SS) codiert, dessen Genprodukte zu ca. 87 % zum LpcGI-2 codierten T4SS (Region I) identisch sind (Schroeder et al., 2010). Des Weiteren wurden vier Genprodukte innerhalb der Region II identifiziert, die in ihrer Proteinsequenz eine Übereinstimmung, zu LpcGI-2 codierten Proteinen der Region II, aufweisen (Abb. 27). Die Genprodukte von *lpw21871*, *lpw22011*, *lpw22101* und *lpw22111* sind zu den codierten Proteinen der Gene *lpc1881* (75 %), *lpc1882* (76 %), *lpc1885* (80 %) und *lpc1886* (93 %) ähnlich. Innerhalb der Region III von LGI-2, werden von den Genen *lpw21201* bis *lpw21251* Proteine codiert, die zu den Genprodukten von *lpc1834* bis *lpc1839* der Region III von LpcGI-2 identisch sind (Abb. 27). Die Proteinsequenzen weisen eine Ähnlichkeit von 87 bis 98 % auf. Zwischen den Aminosäuresequenzen der putativen Integrasen *lpw21181* (LGI-2) und *lpc1833* (LpcGI-2) besteht nur eine Übereinstimmung von 59 % (Abb.27). Auf dem

zweiten genomischen Element von ROD, welches die Gene *lpw22141* bis *lpw22871* (Region IV) umfasst, ist u. a. ein Trb/Tra System codiert (Schroeder et al., 2010). Für Proteine, die auf diesem Element codiert sind, wurde keine Ähnlichkeit zu LpcGI-2 codierten Proteinen gefunden.

Während der *in silico* Analyse wurde im Genom von *Lp* Corby eine weitere genomische Insel identifiziert, die eine zu LpcGI-2 ähnliche genomische Organisation aufweist. Die ca. 120 kb große genomische Insel LpcGI-1 ist innerhalb des tRNA^{Thr} Gens integriert und umfasst die Gene *lpc2314* bis *lpc2190* (Abb. 27). LpcGI-1 codiert ebenfalls für ein putatives Typ IVSS, das aber nur zu ca. 52 % mit demjenigen von LpcGI-2 identisch ist. Von den insgesamt acht Proteinen, die innerhalb der Region II auf LpcGI-2 codiert sind, wurden lediglich drei ähnliche Genprodukte auch innerhalb der Region II von LpcGI-1 identifiziert (Abb. 27). Das Genprodukt von *lpc2306* zeigt nur eine 40 %-ige Übereinstimmung mit demjenigen von *lpc1883*. Die putative Integrase *lpc2307* (LpcGI-1) weist zur Integrase *lpc1884* (LpcGI-2) nur eine Ähnlichkeit von 59 % auf. Das von *lpc2311* codierte Protein, ist zum Antirestriktionsprotein *lpc1886* ebenfalls nur zu 61% ähnlich. Interessanterweise weisen die auf LpcGI-1 codierten HelABC Proteine (*lpc2269* bis *lpc2271*) und CadA (*lpc2268*), zu den entsprechenden Proteinen von LpcGI-2 eine Ähnlichkeit von ca. 94 bis 98% auf. Die Genprodukte von *lpc2267* und *lpc2266*, sind zu den von *lpc1845* (85 %) und *lpc1844* (97 %) codierten Proteinen identisch. Für alle weiteren auf LpcGI-1 codierten Proteine, konnte keine Ähnlichkeit zu Proteinen der genomischen Insel LpcGI-2 festgestellt werden (Abb. 27).

Vor kurzem wurde das Genom des Stammes *L. pneumophila* 570-CO-H (ATCC 43290; Serogruppe 12) sequenziert (Amaro et al., 2012). Ein Sequenzabgleich für die Gene der genomischen Insel LpcGI-2 zeigte, dass im Genom von *Lp* 570-CO-H ein ähnliches genomisches Element vorliegt. Die Genregion *lp12_2057* bis *lp12_2104*, stimmte mit den Genen der Regionen I, II und III von LpcGI-2 überein. Innerhalb der Genregion codieren die Gene *lp12_2074* bis *lp12_2097* für ein putatives GI-T4SS, das eine Übereinstimmung von ca. 98 % mit dem GI-T4SS von LpcGI-2 aufweist. Es wurden jedoch weder „stromabwärts“, noch „stromaufwärts“ der Region *lp12_2057-lp12_2104* ein tRNA Gen identifiziert, das als putativer Integrationsort dienen könnte. Ebenso konnten mittels *in silico* Analyse, im Vergleich zu LpcGI-2, für die Region *lp12_2057-lp12_2104* keine flankierenden Rekombinationsstellen (*attL*, *attR*) identifiziert werden.

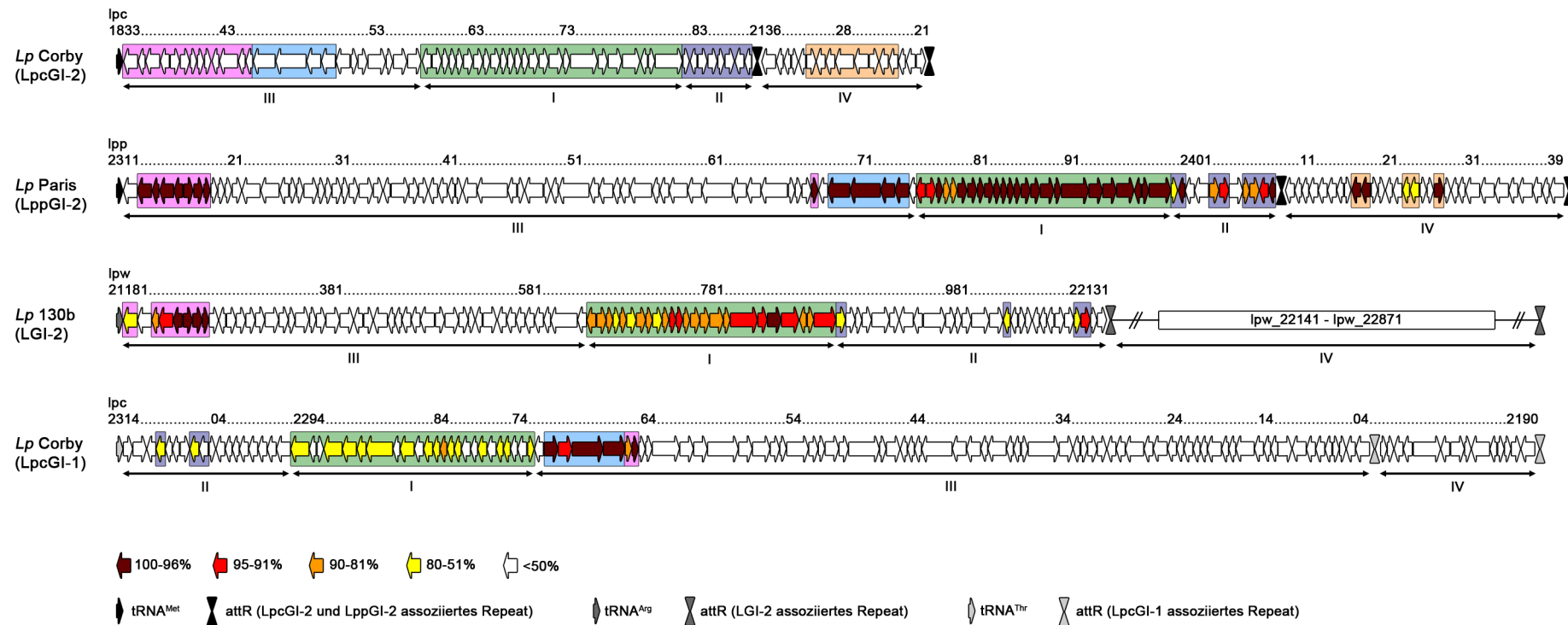


Abb. 27: Genomische Organisation von LpcGI-2 bei *L. pneumophila* Corby und ähnlichen genomischen Inseln bei den *Legionella* Stämmen *Lp* Paris (LppGI-2) und *Lp* 130b (LGI-2), sowie der genomischen Insel LpcGI-1 von *Lp* Corby. Gene, die für ähnliche Proteine bzw. für Genprodukte mit gleicher Funktion codieren, sind mit gleicher Farbe hinterlegt. Das putative Typ IV Sekretionssystem ist mit grün hinterlegt. Die Farbe der Pfeile gibt die Ähnlichkeit, der von LppGI-2, LGI-2 und LpcGI-1 codierten Proteine zu den LpcGI-2 spezifischen Proteine an: dunkelrot=100-90 %; rot=95-91 %; orange=90-81 %; gelb=80-51 %; weiß=50 % und weniger.

3.3 Charakterisierung von LpcGI-1, LpcGI-Asn und LpcGI-Phe bei *L. pneumophila* Corby

3.3.1 Die Analyse von LpcGI-1

Die genomische Insel LpcGI-1 von *L. pneumophila* Corby hat eine Größe von 120.190 bp und umfasst die Gene *lpc2314* bis *lpc2190* (Abb. 28A; siehe Anhang, Tab. 27). Der G+C-Gehalt von LpcGI-1 beträgt ca. 40,5 % und ist um ca. 2 % höher als der G+C-Gehalt des *Lp* Corby Genoms. Die Insel besteht aus zwei genomischen Elementen. Das größere der beiden Elemente (A, *lpc2314* bis *lpc2204*) wurde bereits in einer früheren wissenschaftlichen Arbeit beschrieben (Lautner, 2008). Dieser Teil der genomischen Insel umfasst die Regionen I bis III. Ähnlich zu LpcGI-2, ist auf LpcGI-1 in der Region I (*lpc2273* bis *lpc2296*) ein putatives Typ IV Sekretionssystem lokalisiert. Innerhalb der Region III der genomischen Insel sind Gene lokalisiert, die für verschiedene Effluxsysteme (*helABC*, *cebABC*, *cecABC*), ATP-abhängige Effluxpumpen (*cadA*, *ctpA*, *copA1*, *copA2*) und die Untereinheiten einer ATP-Synthase codieren (Abb. 28A; Tab. 27). Während dieser Arbeit, wurde mittels *in silico* Analyse für LpcGI-1, ein zweites kleineres genomisches Element (B, 13.987 bp, *lpc2203-lpc2190*) als Teil der Insel identifiziert und als Region IV benannt (Abb. 28A). Die Proteine, die in dieser Region codiert sind, wurden zunächst hinsichtlich putativer Funktionen und auf ihre Homologie zu Genprodukten anderer *Legionella* oder „nicht“-*Legionella* Stämme hin untersucht (Tab. 27). Innerhalb der Region IV sind zwei „Repeat“-Regionen, TP1 (*lpc2199*) und TP2 (*lpc2197*) lokalisiert. Des Weiteren sind innerhalb der Region IV Proteine (*lpc2200*, *lpc2198*) codiert, die über eine KAP_NTPase Domäne (pfam07693) verfügen. Neben einem Innenmembranprotein (*lpc2195*), der DNA/RNA Helikase Superfamilie II, ist auch eine Integrase (*lpc2190*) mit einer INT_P4 Domäne (cd00801) codiert, die der DNA_BRE_C Superfamilie (cl00213) der Tyrosin Rekombinasen angehört. Insgesamt sind auf LpcGI-1 drei Gene lokalisiert, die für putative Integrasen (*lpc2307*, *lpc2204* und *lpc2190*) codieren (Tab. 27). Die restlichen Gene der Region IV von LpcGI-1 codieren für Proteine mit unbekannter Funktion.

LpcGI-1 ist innerhalb eines Gens (*lpc2315*, *trnT*) inseriert, welches für die tRNA-Threonin (tRNA^{Thr}) codiert. Ebenso wie für die genomische Insel LpcGI-2, wurden auch bei LpcGI-1 zwei *attR* Sequenzen identifiziert, *attR-1* und *attR-2* (Abb. 28A). Die *attR-1* Sequenz ist zwischen den Genen *lpc2204* und *lpc2203* lokalisiert und *attR-2* befindet sich zwischen *lpc2190* und *lpc2189*. Bei einer Integration der gesamten genomischen Insel LpcGI-1

(*lpc2314* bis *lpc2190*) in das tRNA^{Thr} Gen, befindet sich auf der linken und rechten Seite die Rekombinationsstellen *attL* und *attR-2*. Die „attachment sites“ *attL*, *attR-1* und *attR-2* besitzen eine Länge von 42 bp. Ein Vergleich der DNA-Sequenzen von *attR-1* und *attR-2* zeigte, dass die Sequenzen identisch sind. Hingegen wurden beim Vergleich der *attL* Sequenz mit den *attR* Rekombinationsstellen, an fünf Positionen Unterschiede in der Nukleotidsequenz festgestellt (Abb. 28B, rot-markierte dN). Von 5'→3' ist bei der *attL* Sequenz, im Vergleich mit den *attR*-Sequenzen, an Position 12 ein dG durch ein dT, an Position 18 ein dG durch ein dC, an Position 20 ein dA durch ein dC, an Position 28 ein dC durch ein dT und an Position 32 ein dT durch ein dG ersetzt (Abb. 28B). Ähnlich wie bei LpcGI-2, wurden auch hier die Nukleotidsequenzen „stromaufwärts“ und „stromabwärts“ der Rekombinationsstellen hinsichtlich putativer DNA-Bindestellen für das IHF-Protein untersucht. In der Basenabfolge der genomischen Insel wurden vier DNA-Sequenzen identifiziert, die eine Übereinstimmung mit der IHF-Konsensussequenz WATCAANNNTTR (W=dA oder dT; R=dA oder dG; N=jedes Nukleotid) aufwiesen (Abb. 28B). Die erste IHF-Sequenz AATCAATGAGTTA liegt „stromabwärts“ von *attL* und ist mit der Konsensussequenz identisch. Eine zweite Sequenz AATCAATAGGTCC wurde innerhalb der *attR-1* Rekombinationsstelle gefunden, die jedoch an zwei Positionen von der IHF-Konsensussequenz abweicht. Ein dT ist in der zweiten Sequenz durch ein dC und das postulierte dA oder dG ist ebenfalls durch ein dC ersetzt. „Stromabwärts“ von *attR-1* ist eine dritte DNA-Sequenz AATCAAGTAGTTA lokalisiert, die in ihrer Basenabfolge mit der IHF-Konsensussequenz übereinstimmt. Innerhalb der *attR-2* Rekombinationsstelle wurde eine vierte Sequenz AATCAATAGGTCC identifiziert. Diese vierte Sequenz ist zur zweiten Sequenz ähnlich und weicht ebenso an den zwei beschriebenen Positionen von der postulierten IHF-Konsensussequenz ab. Eine fünfte Sequenz AATCAACTGGTTA ist im Chromosom von *Lp Corby* „stromabwärts“ von *attR-2* lokalisiert und entspricht ebenfalls der IHF-Konsensussequenz (Abb. 28B).

Für LpcGI-2 konnte bereits gezeigt werden, dass die genomische Insel in drei verschiedenen episomalen Formen existieren kann. Die genomische Organisation der *Lp Corby* Inseln LpcGI-2 und LpcGI-1 ist sehr ähnlich, daher stellte sich die Frage, inwieweit auch ähnliche episomalen Formen von LpcGI-1 vorliegen. Analog zu LpcGI-2, erfolgte der Nachweis der episomalen und chromosomalen Formen der genomischen Insel LpcGI-1 mittels PCR (35 und 40 Zyklen), unter Verwendung spezifischer Primerpaare (Abb. 28D). Als Template diente in der PCR-Reaktion chromosomale DNA (200 ng/μl).

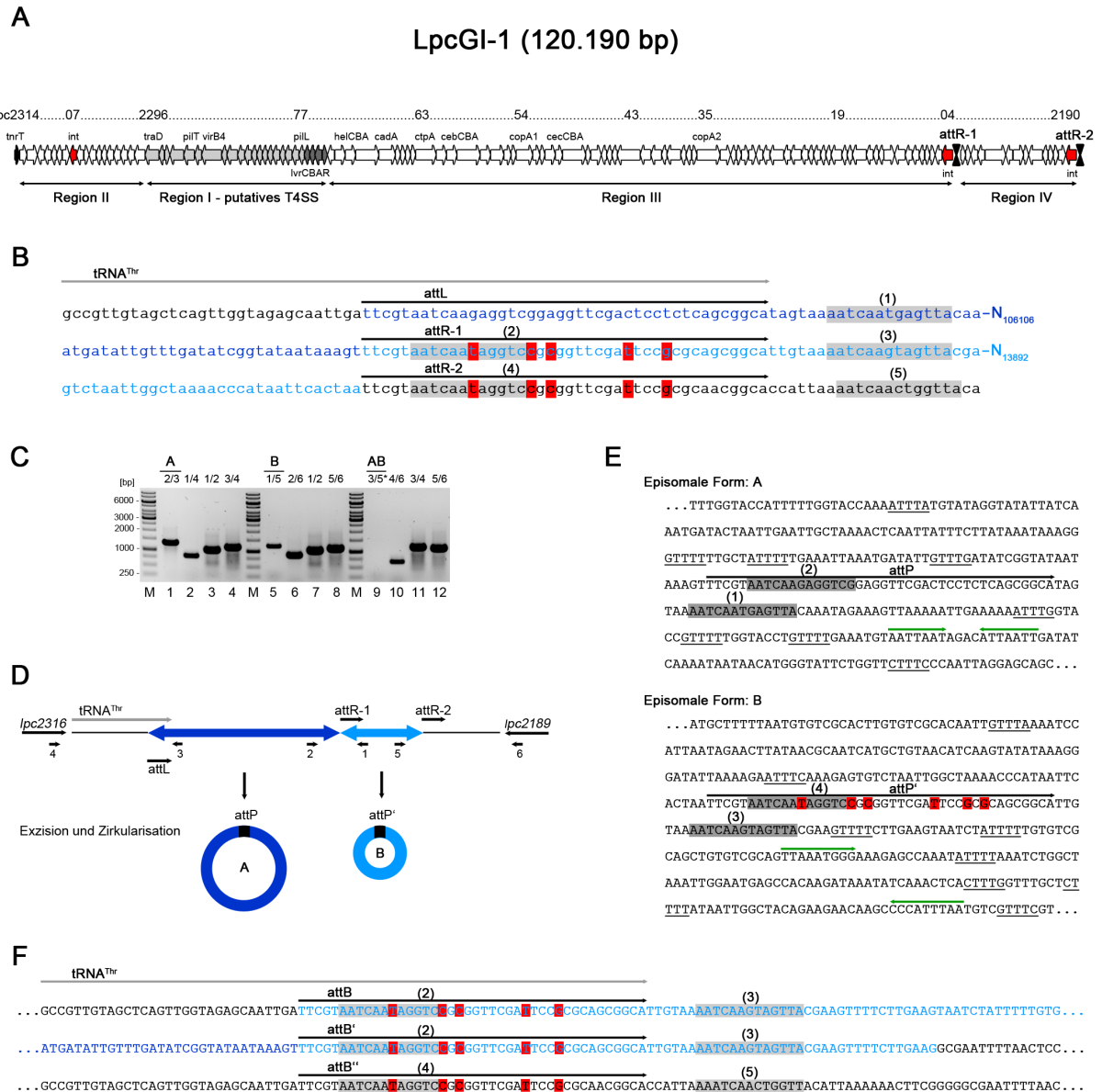


Abb. 28: (A) Genetische Organisation der genomischen Insel LpcGI-1 bei *L. pneumophila* Corby. (B) Darstellung der Integration von LpcGI-1 in das tRNA^{Thr} Gen mit den Rekombinationsstellen attL, attR-1 und attR-2 (schwarze Pfeile). Abweichungen in der DNA-Sequenz der attR-Sequenzen zu attL, sind rot markiert. LpcGI-1 besteht aus den zwei Elementen A (blaue Sequenz) und B (hellblaue Sequenz). Chromosomale DNA ist in schwarzer Schrift dargestellt. Die Zahlen 1, 2, 3, 4 und 5 kennzeichnen die IHF-Konsensussequenz WATCAANNNTTR (W=dA oder dT; R=dA oder dG; N=jedes Nukleotid), die mit grau hinterlegt ist. (C) Ergebnisse der PCR Analyse von LpcGI-1. Zum Nachweis der episomalen Formen diente die Primerpaare 2/3 (Spur 1), 1/5 (Spur 5) und 3/5 (Spur 9). Das intakte tRNA^{Thr} Gen wurde mit dem Primerpaar 1/4 (Spur 2) und 4/6 (Spur 10) und attB' mit 2/6 (Spur 6) detektiert. Die chromosomale Form der genomische Insel wurde mit den Primerkombinationen 1/2 (Spur 3 und 7), 3/4 (Spur 4 und 11) und 5/6 (Spur 8 und 12) nachgewiesen. Die PCR erfolgte mit 35 und 40 (*) Zyklen. (D) Mechanismus bei der Bildung der zirkulären episomalen Formen A und B von LpcGI-1 aus der chromosomalen Form. Bei der Exzision rekombinieren die Rekombinationsstellen attL und attR-1 bzw. attR-2 zu attP bzw. attP'. Die Zahlen 1 bis 6 kennzeichnen die Orientierung und die Hybridisierungsstellen der Primer. 1=LpcGI-1-1U; 2=LpcGI-1-2R; 3=LpcGI-1-3U; 4=LpcGI-1-4R; 5=LpcGI-1-5R; 6=LpcGI-1-6U. (E) Nukleotidsequenz von attP und attP' (schwarzer Pfeil) bei den zirkulären Formen von LpcGI-1. Dargestellt sind IHF-Sequenzen (grau hinterlegt), die DNA-Sequenzwiederholungen NTTN (unterstrichen) und die IR-Sequenz (grüne Pfeile). (F) Nukleotidsequenzen der Rekombinationsstellen attB, attB' und attB'' (schwarzer Pfeil), die nach der Exzision von LpcGI-1 in Chromosom verbleiben.

Um Rückschlüsse auf mögliche Rekombinationsmechanismen schließen zu können, wurden zusätzlich alle PCR-Produkte der zirkulären Formen A (2/3) und B (1/5) und der „intakten“ tRNA Gene (1/4 und 4/6) bzw. der *attB*⁺ Sequenz (2/6) sequenziert. Wie bereits für LpcGI-2 beschrieben, wurden die PCR-Produkte zunächst in den Vektor pGEM-T Easy kloniert und anschließend mit den MCS-Primern M13-U bzw. M13-R sequenziert. Zu Kontrolle der Ergebnisse, erfolgte auch hier für jedes PCR-Produkt die Sequenzierung mehrerer rekombinanter Plasmide, die von verschiedenen *E. coli* Klonen stammten.

Für die Detektion der zirkulären episomalen Formen A wurden das Primerpaar 2/3 (LpcGI-1-2R/LpcGI-1-3U) verwendet. Die Ergebnisse der PCR zeigten, dass das größere genomische Element A (*lpc2314-lpc2204*) aus dem Chromosom ausgeschnitten werden kann und in die episomale Form A überführt wird (Abb. 28C, Spur 1 und 28D). Durch die Exzision rekombinieren die *attL* und *attR*-1 Sequenzen zu *attP*. Durch die Sequenzierung des PCR-Produktes 2/3 ließ sich erkennen, dass die Basenabfolge von *attP*, mit derjenigen von *attL* identisch ist (Abb. 28B und 28E). Das Ergebnis wurde durch die Sequenzierung von zwei Kolonen bestätigt. Durch eine nähere Betrachtung der Nukleotidsequenzen, wurden sowohl „stromaufwärts“, als auch „stromabwärts“ von *attP*, mehrere DNA-Sequenzwiederholungen der Form NTTTN gefunden. Zusätzlich wurde auch „stromabwärts“ von *attP* eine kurze „Inverted Repeat“ (IR) Sequenz 5'-AATTAAT-N₄-ATTAATT-3' identifiziert (Abb. 28E). Bei der Exzision des Elements A und der Bildung der zirkulären Form A, verbleibt im Chromosom von *Lp* Corby das „intakte“ tRNA^{Thr} Gen mit der Rekombinationsstelle *attB* (Abb. 28F). Das „intakte“ tRNA^{Thr} Gen wurde mit dem Primerpaar 1/4 (LpcGI-1-1U/LpcGI-1-4R) amplifiziert (Abb. 28C, Spur 2) und anschließend sequenziert. Die Sequenzierung des PCR-Produktes 1/4 zeigte bei zwei Klonen eine Übereinstimmung der Sequenzen von *attB* und *attR*-1 (vgl. Abb. 28B und F).

Durch die Kombination der Primer 1/5 (LpcGI-1-1U/LpcGI-1-5R), wurde das genomische Element B bzw. die Region IV auf eine episomale Form hin untersucht. Es zeigte sich, dass diese Region, ähnlich wie bei LpcGI-2, auch bei LpcGI-1 als zirkuläre episomale Form B vorliegen kann (Abb. 28C, Spur 5 und 28D). In diesem Fall kommt es zu einer Rekombination von *attR*-1 mit *attR*-2 zu *attP*⁺. Aus den Daten der DNA-Sequenzierung des PCR-Produktes 1/5 ließ sich nicht erkennen, ob es sich bei *attP*⁺ um die ursprüngliche Sequenz von *attR*-1 oder *attR*-2 handelt, da beide Sequenzen identisch sind. Die Nukleotidsequenz „stromaufwärts“ von *attP*⁺, entspricht der DNA-Sequenz „stromaufwärts“ von *attR*-2. Ebenso stimmt die Basensequenz „stromabwärts“ von *attP*⁺, mit der Sequenz „stromabwärts“ von *attR*-1 überein (vgl. Abb. 28B und E). Dieses Ergebnis wurde auch durch

die Sequenzierung von sechs Klonen bzw. rekombinanten Plasmiden bestätigt. Ähnlich zu *attP*, wurden auch „stromaufwärts“ und „stromabwärts“ von *attP* kurze Sequenzwiederholungen der Form NTTTTN identifiziert (Abb. 28E). Des Weiteren wurde ebenfalls „stromabwärts“ von *attP* eine IR-Sequenz 5'-TTAAATGGG-N₁₀₄-CCCATTAA-3' gefunden. Diese Sequenz weist zur IR-Sequenz von *attP* keine Ähnlichkeit auf. Mit dem Primerpaar 2/6 (LpcGI-1-2R/LpcGI-1-6U) wurde die Rekombinationsstelle *attB* amplifiziert (Abb. 28C, Spur 6 und 28D). Die Sequenzierung von zwei Klonen ließ erkennen, dass nach der Rekombination von *attR*-1 und *attR*-2 und der daraus resultierenden Exzision des Elements B, eine Sequenz im Chromosom verbleibt, die mit *attR*-1 und den nachfolgenden 29 Nukleotiden übereinstimmte (Abb. 28F).

Es konnte hier gezeigt werden, dass sowohl das größere, als auch das kleine Element von LpcGI-1 als episomale Form A bzw. B vorliegen können. Nun stellte sich die Frage nach einer episomalen Form AB, wie sie bereits für die genomische Insel LpcGI-2 beschrieben wurde (siehe Ergebnisse, 3.2.1). Die Kombination der Primer 3/5 (LpcGI-1-1U/LpcGI-1-5R) wurde zur Detektion der zirkulären Form AB bzw. der gesamten genomischen Insel LpcGI-1 (*lpc2314-lpc2190*) verwendet (Abb. 28D). Wie die Ergebnisse der PCR Analyse zeigten, konnte für LpcGI-1 auch mit 40 PCR-Zyklen die zirkuläre Form AB nicht nachgewiesen werden (Abb. 28B, Spur 9). Obwohl für LpcGI-1 keine zirkuläre Form AB detektiert werden konnte, wurde mit dem Primerpaar 4/6 (Lpc-GI4-4R/Lpc-GI4-6U) dennoch ein intaktes tRNA^{Thr} Gen amplifiziert (Abb. 28C, Spur 10). Wenn beide Elemente der genomischen Insel in den episomalen Formen A und B vorlagen, dann verblieb im bakteriellen Chromosom das „intakte“ tRNA^{Thr} Gen mit der Rekombinationsstelle *attB* (Abb. 28F). Die Sequenz von *attB* und die Nukleotidsequenz „stromabwärts“ der Rekombinationsstelle, war bei beiden sequenzierten Klonen mit derjenigen von *attR*-1 bzw. der nachfolgenden Basensequenz identisch (vgl. Abb. 28B und F).

Die chromosomalen Formen von LpcGI-1 konnten mit den Primerpaaren 1/2 (LpcGI-1-1U/LpcGI-1-2R), 3/4 (LpcGI-1-3U/LpcGI-1-4R) und 5/6 (LpcGI-1-5R/LpcGI-1-6U) nachgewiesen werden (Abb. 28D). Die Ergebnisse lassen erkennen, dass das Element A (Abb. 28C, Spur 3 und 4) und das Element B (Abb. 28C, Spur 7 und 8) unabhängig voneinander in einer chromosomalen Form existieren können. Ebenso kann auch die gesamte Insel als Element AB in das bakterielle Chromosom integriert sein (Abb. 28C, Spur 11 und 12).

Wie bereits für die genomische Insel LpcGI-2 beschrieben wurde, kann auch LpcGI-1 sowohl in verschiedenen zirkulären episomalen, als auch in mehreren integrierten chromosomalen Formen existieren. In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die

genomische Insel LpcGI-1, in den zwei episomalen Formen A und B vorliegen kann. Die beiden Elemente A und B, aus denen die episomalen Formen hervorgehen, können unabhängig voneinander in einer zirkulären und chromosomalen Form existieren. Eine dritte episomale Form AB, für die gesamte genomische Insel, konnte bei LpcGI-1 nicht detektiert werden.

3.3.2 Die Analyse von LpcGI-Asn

Bei einem *in silico* „Screen“ der tRNA Gene auf insertierte genomische Elemente, wurde im Genom von *L. pneumophila* Corby eine weitere genomische Insel (LpcGI-Asn) identifiziert. LpcGI-Asn hat eine Größe von 6.066 bp (Abb. 29A; siehe Anhang, Tab. 28). Die genomische Insel ist innerhalb des für die tRNA-Asparagin (*lpc0092*, *trnN*; tRNA^{Asn}) codierenden Gens insertiert und umfasst die Gene *lpc0091* bis *lpc0085* (Abb. 29A; Tab.28). LpcGI-Asn codiert u. a. für LvrA (*lpc0088*), einem *Legionella vir* Region Protein und einer Integrase (*lpc0085*). Die Proteinsequenz der LpcGI-Asn spezifischen Integrase weist eine INT_P4 Domäne (cd00801) auf und gehört zur DNA_BRE_C Superfamilie (cl00213) der Tyrosin Rekombinasen. Die Gene *lpc0091* und *lpc0090* codieren für Proteine mit unbekannter Funktion. Das Gen *lpc0089* codiert für ein hypothetisches Protein. Ein BLAST der Proteinsequenz lieferte für *lpc0089* weder eine Übereinstimmung zu Sequenzen anderen *Legionella* Stämme, noch zu Proteinen anderer bisher sequenzierter Organismen. Die beiden Gene *lpc0087* und *lpc0086* codieren vermutlich für ein putatives Toxin-Antitoxin System. Das von *lpc0087* codierte Protein, besitzt eine Übereinstimmung von 64% zu einer putativen Antitoxin Komponente von *Vibrio scophthalmi* und verfügt über eine HTH_XRE Domäne (cd00093), die für Transkriptionsregulatoren charakteristisch ist. Die Proteinsequenz von *lpc0086* ist zu 78 % mit einer putativen Toxin Komponente von *Vibrio scophthalmi* identisch. Die Aminosäuresequenzen der beiden Gene (*lpc0087* und *lpc0086*) sind zu 100 % mit den Aminosäuresequenzen, den von *lpp0074* bzw. *lpc0073* codierenden Proteinen identisch (Tab. 28).

Ist LpcGI-Asn in das bakterielle Chromosom integriert, dann befinden sich auf der linken und rechten Seite der genomischen Insel die Rekombinationsstellen bzw. „attachment sites“ *attL* und *attR*. Bei den Rekombinationsstellen von LpcGI-Asn handelt es sich um eine DNA-Sequenz von 48 bp. Die *attL* und *attR* Sequenzen sind mit dem 3'-Ende, des für die tRNA^{Asn}

codierenden Gens identisch (Abb. 29B). Die *attR*-Sequenz ist zwischen den Genen *lpc0085* und *lpc0084* lokalisiert.

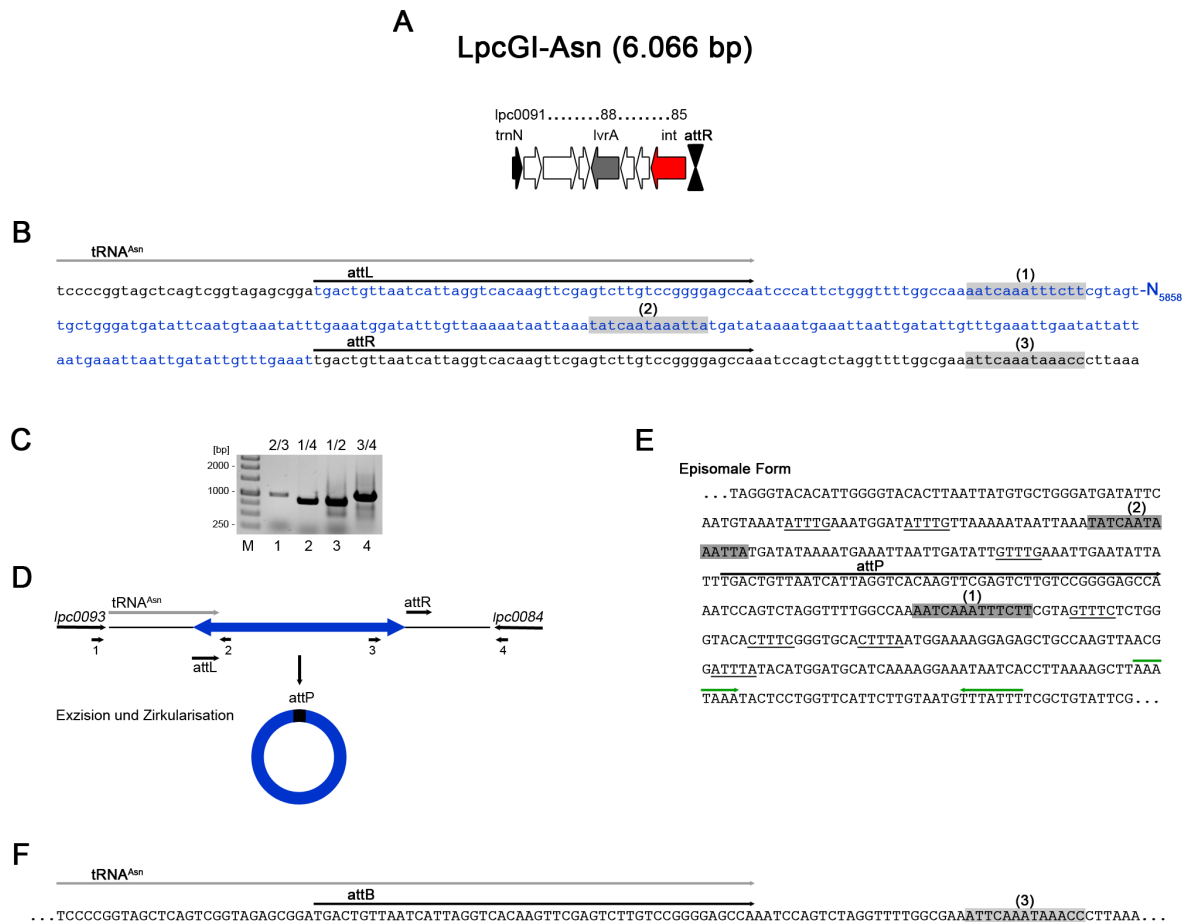


Abb. 29: (A) Genetische Organisation der genomischen Insel LpcGI-Asn bei *L. pneumophila* Corby. (B) Darstellung der Integration von LpcGI-Asn in das $tRNA^{Asn}$ Gen mit den Rekombinationsstellen *attL* und *attR* (schwarze Pfeile). Die DNA-Sequenz der genomischen Insel ist in blauer und die chromosomale DNA in schwarzer Schrift dargestellt. Die Zahlen 1, 2 und 3 kennzeichnen die IHF-Konsensussequenz WATCAANNNTTR (W=dA oder dT; R=dA oder dG; N=jedes Nukleotid), die mit grau hinterlegt ist. (C) Ergebnisse der PCR Analyse von LpcGI-Asn. Zum Nachweis der episomalen Form diente das Primerpaar 2/3 (Spur 1). Das intakte $tRNA^{Asn}$ Gen wurde mit dem Primerpaar 1/4 detektiert (Spur 2). Die chromosomale Form der genomischen Insel wurde mit den Primerkombinationen 1/2 und 3/4 nachgewiesen (Spur 3 und 4). (D) Mechanismus bei der Bildung der zirkulären episomalen Form von LpcGI-Asn aus der chromosomalen Form. Bei der Exzision rekombinieren die Rekombinationsstellen *attL* und *attR* zu *attP*. Die Zahlen 1 bis 4 kennzeichnen die Orientierung und die Hybridisierungsstellen der Primer. 1=LpcGI-Asn-1U; 2=LpcGI-Asn-2R; 3=LpcGI-Asn-3U; 4=LpcGI-Asn-4R. (E) Nukleotidsequenz der *attP*-„site“ (schwarzer Pfeil) bei der zirkulären Form von LpcGI-Asn. Dargestellt sind IHF-Sequenzen (grau hinterlegt), die DNA-Sequenzwiederholungen NTTTN (unterstrichen) und die IR-Sequenz (grüne Pfeile). (F) Nukleotidsequenz der Rekombinationsstelle *attB* (schwarzer Pfeil), die nach der Exzision von LpcGI-Asn in Chromosom verbleibt.

Auf der gnomischen Insel wurden zwei DNA-Sequenzen identifiziert, die eine Übereinstimmung mit der IHF-Konsensussequenz **WATCAANNNTTR** (W=dA oder dT; R=dA oder dG; N=jedes Nukleotid) aufweisen. „Stromabwärts“ von *attL* befindet sich die DNA-Sequenz **AATCAAATTTCTT**, die zur IHF-Konsensussequenz ähnlich ist. Diese Sequenz weist an zwei Positionen eine Abweichung von der postulierten IHF-Konsensussequenz auf. Ein dT ist hier durch ein dC ersetzt und anstelle der Nukleotidbasen dA oder dG, befindet sich ein dT. Eine zweite IHF-Konsensussequenz **TATCAATAAATTA** liegt „stromaufwärts“ von der *attR* Sequenz. Im Genom wurde „stromabwärts“ eine dritte DNA-Sequenz **ATTCAAATAAAC** identifiziert, die jedoch mit den Nukleotidbasen „ACC“, nicht der Form „TTR“ der IHF-Konsensussequenz entspricht (Abb. 29B).

Die genomische Insel LpcGI-Asn ist mit rund 6 kb deutlich kleiner als die bisher untersuchten Inseln Trb-1, LpcGI-2 und LpcGI-1 und weist darüber hinaus auch eine andere genomische Organisation auf. LpcGI-Asn codiert ebenfalls für eine ortsspezifische Integrase, die eine Exzision der genomischen Insel katalysieren könnte. Eine interessante Frage war daher, ob es sich bei LpcGI-Asn nur um ein chromosomales Element handelt oder ob auch eine episomale Form existiert. Wie bereits bei den zuvor beschriebenen genomischen Inseln, erfolgte auch bei LpcGI-Asn die Charakterisierung mittels PCR (35 Zyklen). Als Template diente chromosomale DNA (200 ng/μl). Zum Nachweis der episomalen und chromosomalen Form von LpcGI-Asn wurden spezifische Oligonukleotide generiert (Abb. 29D). Für eine präzise Analyse wurde jeweils das PCR-Produkt der zirkulären Form (2/3) und des „intakten“ tRNA^{Asn} Gens (1/4) sequenziert. Analog zu LpcGI-2 und LpcGI-1 wurden die PCR-Produkte zunächst in den Vektor pGEM-T Easy kloniert und anschließend sequenziert. Zur Kontrolle der Ergebnisse wurden die rekombinanten Plasmide aus jeweils zwei *E. coli* Klonen sequenziert. Das Primerpaar 2/3 (LpcGI-Asn-2R/LpcGI-Asn-3U) diente zur Detektion der zirkulären episomalen Form. Mit den Primerkombinationen 1/2 (LpcGI-Asn-1U/LpcGI-Asn-2R) und 3/4 (LpcGI-Asn-3U/LpcGI-Asn-4R) wurde, die in das Chromosom integrierte Form nachgewiesen. Das „intakte“ tRNA^{Asn} Gen wurde mit dem Primerpaar 1/4 (LpcGI-Asn-1U/LpcGI-Asn-4R) amplifiziert. Die Ergebnisse lassen erkennen, dass die genomische Insel LpcGI-Asn in der bakteriellen Zelle sowohl in einer zirkulären episomalen (Abb. 29C, Spur 1), als auch in einer integrierten chromosomalen Form vorliegen kann (Abb. 29C, Spur 3 und 4). Bei einer Exzision der genomischen Insel konnte das „intakte“ tRNA^{Asn} Gen detektiert werden (Abb. 29C, Spur 2). Die Exzision von LpcGI-Asn aus dem Chromosom und das Vorliegen als zirkuläre episomale Form, wurde zusätzlich durch die Sequenzierung der PCR-Produkte 2/3 und 1/4 bestätigt. Bei der Exzision der genomischen Insel aus dem Chromosom,

rekombinieren die *attL* und *attR*-Sequenz zu *attP* (Abb. 29D und E). Im Chromosom verbleibt das intakte tRNA^{Asn} Gen mit der *attB* Sequenz (Abb. 29F). Die DNA-Sequenzierung der PCR-Produkte 2/3 und 1/4 zeigt, dass die Sequenzen von *attP* und *attB*, zu denjenigen von *attL* bzw. *attR* identisch sind. In der zirkulären Form von LpcGI-Asn befindet sich „stromaufwärts“ von *attP* die IHF-Sequenz (2), welche in der genomischen Form „stromaufwärts“ von *attR* lag. Die IHF-Sequenz (1), die bei der chromosomalen Form von LpcGI-Asn, „stromabwärts“ von *attL* liegt, ist in der episomalen Form ebenfalls „stromabwärts“ von *attP* lokalisiert. Zusätzlich wurden „stromaufwärts“ und „stromabwärts“ von *attP*, kurze DNA-Sequenzwiederholungen der Form NTTTN gefunden. Auch eine „Inverted Repeat“ (IR) –Sequenz 5'-AAATAAA-N₂₄-TTTATTT-3' wurde „stromabwärts“ von *attP* identifiziert (Abb. 29E). Wie bereits für die genomischen Inseln LpcGI-2 und LpcGI-1, konnte in dieser Arbeit erstmals auch für LpcGI-Asn gezeigt werden, dass die Insel in einer zirkulären episomalen und in einer in das Chromosom integrierten Form existieren kann.

3.3.3 Die Analyse von LpcGI-Phe

Neben LpcGI-Asn, wurde in dieser Arbeit durch eine *in silico* Analyse der tRNA Gene, ein weiteres genetisches Element identifiziert. Die genomische Insel LpcGI-Phe ist 11.554 bp groß und ist innerhalb des Gens *trnF* (*lpc1383*) lokalisiert, welches für die tRNA-Phenylalanin (tRNA^{Phe}) codiert (Abb. 30A). LpcGI-Phe umfasst die 12 Gene *lpc1384-lpc1395* (Abb. 30A; siehe Anhang, Tab. 29). Auf dem Element sind drei Gene lokalisiert, die für Transposasen codieren. Das Gen *lpc1384* codiert für eine TpnA Transposase, die in ihrer Proteinsequenz eine „pfam1610“ Domäne besitzt. Eine zweite Transposase wird durch *lpc1388* codiert. Dieses Protein besitzt eine ATP-bindende Sequenz und ein Walker-A-Motiv und gehört zur P-Loop-NTPase Superfamilie (cl09099). Beim Protein, welches durch *lpc1389* codiert wird, handelt es sich um eine putative Transposase, mit einer rve-Domäne (pfam00665). Auf dem genomischen Element LpcGI-Phe sind zwei putative Integrasen der DNA_BRE_C Superfamilie (cl00213) lokalisiert. Das von *lpc1391* codierte Protein, ist ähnlich zu den Prophagen-Integrasen (pfam12835) und *lpc1395* codiert für eine Integrase mit einer INT_P4 Domäne (cd00801). Die restlichen Gene, die auf LpcGI-Phe lokalisiert sind, codieren für Proteine mit bisher unbekannter Funktion. Für diese Proteine konnten lediglich

Gene anderer *Legionella* Stämme bzw. anderer Prokaryoten zugewiesen werden, die ebenfalls für Proteine unbekannter Funktion codieren (Tab. 29).

Die *in silico* Analyse der Integrationsstellen zeigte, dass bei einer Integration von LpcGI-Phe in das Chromosom von *Lp* Corby, sich auf der linken und rechten Seite des Elements die 49 bp langen Rekombinationsstellen *attL* und *attR* befinden. Durch den Vergleich der Basenabfolge von *attL* und *attR* ließ sich erkennen, dass die Sequenzen identisch sind (Abb. 30B). Die *attR*-Sequenz liegt innerhalb des Gens *lpc1396*, welches ebenfalls für eine tRNA^{Phe} codiert. „Stromabwärts“ von *attL* wurde die DNA-Sequenz AATCAATAGGTTA identifiziert, die identisch zur IHF-Konsensussequenz WATCAANNNTTR (W=dA oder dT; R=dA oder dG; N=jedes Nukleotid) ist. Im Gegensatz zu LpcGI-Asn, wurde auf der genomischen Insel LpcGI-Phe „stromaufwärts“ von *attR* keine DNA-Sequenz gefunden, die eine Ähnlichkeit zur IHF-Konsensussequenz aufwies. Außerhalb des Elements, wurde „stromabwärts“ von *attR*, die DNA-Sequenz AATCAATGGCTCT identifiziert, die ähnlich zur IHF-Konsensussequenz ist (Abb. 30B).

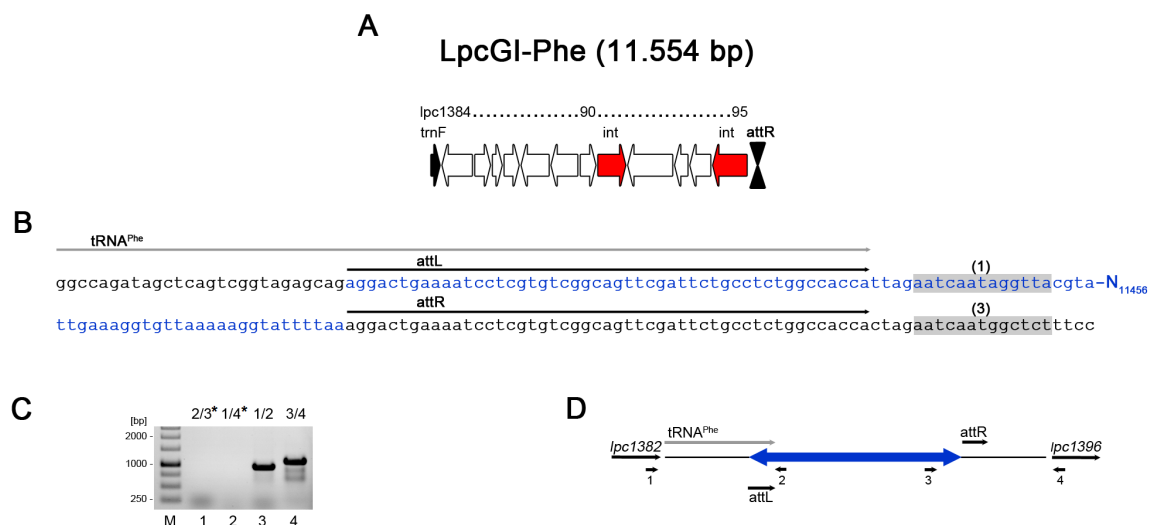


Abb. 30: (A) Genetische Organisation der genomischen Insel LpcGI-Phe bei *L. pneumophila* Corby. (B) Darstellung der Integration von LpcGI-Phe in das tRNA^{Phe} Gen mit den Rekombinationsstellen *attL* und *attR* (schwarze Pfeile). Die DNA-Sequenz der genomischen Insel ist in blauer und die chromosomale DNA in schwarzer Schrift dargestellt. Die Zahlen 1 und 3 kennzeichnen die IHF-Konsensussequenz WATCAANNNTTR (W=dA oder dT; R=dA oder dG; N=jedes Nukleotid), die mit grau hinterlegt ist. (C) Ergebnisse der PCR Analyse von LpcGI-Phe. Zum Nachweis der episomalen Form diente das Primerpaar 2/3 (Spur 1). Das intakte tRNA^{Phe} Gen wurde mit dem Primerpaar 1/4 detektiert (Spur 2). Die chromosomale Form der genomische Insel wurde mit den Primerkombinationen 1/2 und 3/4 nachgewiesen (Spur 3 und 4). Die PCR-Reaktion erfolgte mit 35 bzw. 40 (*) Zyklen. (D) Schematische Darstellung von LpcGI-Phe in der chromosomalen Form. Die Zahlen 1 bis 4 kennzeichnen die Orientierung und die Hybridisierungsstellen der Primer. 1=LpcGI-Phe-1U; 2=LpcGI-Phe-2R; 3=LpcGI-Phe-3U; 4=LpcGI-Phe-4R.

Ähnlich wie bei LpcGI-Asn, ist auch die genomische Organisation von LpcGI-Phe, zu den vergleichsweise großen Inseln Trb-1, LpcGI-2 und LpcGI-1 unterschiedlich. Jedoch codiert auch LpcGI-Phe für zwei ortsspezifische Integrasen. Daher war es von Interesse zu untersuchen, in wie fern auch die genomische Insel LpcGI-Phe in einer episomalen Form vorliegen kann. Die Kontrolle der genomischen Insel LpcGI-Phe auf eine zirkuläre episomale und eine chromosomale Form, erfolgte mittels PCR (35 und 40 Zyklen), mit chromosomaler DNA als Template (200 ng/μl). Zum Nachweis der episomalen und chromosomalen Formen, wurden analog zu den bisher untersuchten genomischen Inseln, spezifische Oligonukleotidpaare verwendet (Abb. 30D). Die Primerkombination 2/3 (LpcGI-Phe-2R/LpcGI-Phe-3U) diene zum Nachweis der episomalen Form und mit 1/4 (LpcGI-Phe-1U/LpcGI-Phe-4R) sollte das „intakte“ tRNA^{Phe} Gen amplifiziert werden. Für die genomische Insel LpcGI-Phe konnte auch bei einer PCR mit 40 Zyklen, keine zirkuläre episomale Form detektiert werden (Abb. 30C, Spur 1). Erwartungsgemäß wurde auch kein „intaktes“ tRNA^{Phe} (*lpc1383*) Gen amplifiziert (Abb. 30C, Spur 2). Die Integration von LpcGI-Phe in das Chromosom von *Lp* Corby, wurde mit den Primerpaaren 1/2 (LpcGI-Phe-1U/LpcGI-Phe-2R) und 3/4 (LpcGI-Phe-3U/LpcGI-Phe-4R) gezeigt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die genomische Insel LpcGI-Phe bei *Lp* Corby vermutlich nur in einer chromosomalen Form existiert (Abb. 30C, Spur 3 und 4).

4 Diskussion

4.1 Die Analyse der genomischen Insel Trb-1

4.1.1 Die Exzision und Konjugation von Trb-1 sind Integrase abhängig

Die genomischen Inseln Trb-1 und Trb-2 von *L. pneumophila* Corby codieren jeweils für ein Konjugations-/Typ IVA Sekretionssystem, dessen Organisation eine Ähnlichkeit zur *tra/trb* Region des IncP β Plasmids R751 von *Enterobacter aerogenes* aufweist. Es konnte bereits gezeigt werden, dass beide genomischen Inseln sowohl in einer zirkulären episomalen Form vorliegen können, als auch in das Chromosom von *Lp* Corby integriert werden können. In der chromosomalen Form ist Trb-1 in das tRNA^{Pro} Gen (*lpc2778*) und Trb-2 in das tmRNA Gen (*lpc0163*) inseriert (Glöckner et al., 2008). Neben dem Trb/Tra Konjugationssystem, ist auf jeder der genomischen Inseln eine ortsspezifische Integrase, Int-1 (*lpc2818*) und Int-2 (*lpc0199*), codiert. Die ortsspezifischen Integrasen Int-1 und Int-2 sind Tyrosin-Rekombinasen, die zur DNA_BRE_C Superfamilie (cl00213) gehören. Die Mitglieder dieser Familie verfügen über eine C-terminale katalytische Domäne und über einen Tyrosinrest im aktiven Zentrum des Enzyms (Grindley et al., 2006; Rajeev et al., 2009).

Von Glöckner et al., (2008) wurde bereits spekuliert, dass die auf Trb-1 und Trb-2 lokalisierten Integrasen, die Mechanismen der Integration und Exzision, der jeweiligen genomischen Insel katalysieren könnten. Die These konnte in dieser Arbeit für Trb-1 experimentell, durch die Generierung einer Integrase Deletionsmutante (Δ *int-1*; *lpc2818::Km^R*), beim Stamm *Lp* Corby belegt werden. Die Ergebnisse der PCR- und Real-time PCR (qPCR) Analysen zeigen deutlich, dass die Mechanismen der Exzision und Integration, bei Trb-1 von der ortsspezifischen Integrase Int-1 abhängig sind. Im Vergleich zum „Wildtyp“ *Lp* Corby, konnte bei der Integrase Mutante Δ *int-1* mittels PCR keine zirkuläre episomale Form von Trb-1 (Trb-1_{ci}) detektiert werden. Auch das „intakte“ tRNA^{Pro} Gen wurde bei Δ *int-1* nicht amplifiziert. Die Ergebnisse der PCR-Analyse konnten durch eine qPCR-Analyse bestätigt werden. Die Daten der qPCR zeigen, dass im Vergleich zum „Wildtyp“, bei Δ *int-1* die Bildung der zirkulären episomalen Form Trb-1_{ci} ca. um das 30-fache reduziert war. Trb-1 lag bei der Δ *int-1* Mutante hauptsächlich in der chromosomalen Form vor. Dennoch konnten bei der Integrase Mutante geringe Mengen der episomalen Form

detektiert werden. Es ist bisher noch nicht untersucht worden, welche weiteren Proteine an der Exzision von Trb-1 beteiligt sind. Für den Lambda Phagen ist bekannt, dass an der Exzision des Phagen zusätzlich auch eine Exzisionase beteiligt ist (Cho et al., 2002). Auf den genomischen Inseln Trb-1 und Trb-2 ist jeweils ein putatives Exzisionase-ähnliches Protein (*lpc2780*; 65 Aminosäuren bzw. *lpc0198*; 68 Aminosäuren) codiert (Glöckner et al., 2008). Es ist auch nicht ganz auszuschließen, dass eine Integrase unabhängige Exzision von Trb-1, durch die Aktivität von RecA vermittelt werden könnte. Das *E. coli* RecA-Protein spielt eine wichtige Rolle in der DNA Reparatur und katalysiert durch eine Rekombinaseaktivität den Austausch von dsDNA Molekülen (Bell, 2005). *L. pneumophila* codiert ebenfalls für ein funktionelles RecA Protein (Dreyfus, 1989). Aufschluss über eine mögliche Beteiligung von RecA an der Exzision von Trb-1 bei *Lp* Corby, könnte nur die Generierung einer $\Delta int-1 \Delta recA$ Doppelmutante geben. Hingegen konnten keine Hinweise gefunden werden, dass der Verlust der Funktion von Int-1, durch die Aktivität der ortsspezifischen Integrase Int-2 komplementiert werden könnte. Eine Komplementation von Int-1 durch Int-2 kann auch anhand der Ergebnisse aus der PCR-Analyse und aufgrund der geringen Homologie zwischen Int-1 und Int-2 ausgeschlossen werden. Die Aminosäuresequenzen von Int-1 und Int-2 zeigen nur eine Übereinstimmung von 38 % (Glöckner et al., 2008). Zudem weist die Trb-1 Integrase in ihrer Sequenz eine Ähnlichkeit zu P4 Integrasen (cd00801) von Bakteriophagen auf, die u. a. in Verbindung mit temperenten Phagen, integrativen Plasmiden, Pathogenitätsinseln und anderen genomischen Elementen gefunden werden (Buchrieser et al., 1998; Pierson und Kahn, 1987). Bei der Integrase Int-2 handelt es sich hingegen um eine putative Lambdoid Prophagen Integrase, die mit den Int_{phiCTX} Phagen Integrasen (cd01191) verwandt ist (Huber und Waldor, 2002). Da die genomischen Inseln Trb-1 und Trb-2 in unterschiedliche tRNA Gene integrieren, erkennen Int-1 und Int-2 jeweils unterschiedliche Rekombinationsstellen, wodurch eine gegenseitige Komplementation ebenfalls fraglich ist. Bei den nahe verwandten Phagen-Integrasen λ und HK022 wurde festgestellt, dass durch Unterschiede in der Erkennungssequenz, eine Rekombination an den *att*-Sequenzen der jeweils anderen Integrase nicht vermittelt werden kann (Nagaraja und Weisberg, 1990). Die Ergebnisse der PCR-Analyse zeigen auch, dass der Funktionsverlust der ortsspezifischen Integrase von Trb-1, keinen Einfluss auf die Bildung der zirkulären episomalen Form von Trb-2 hat. Die episomale Form von Trb-2 wurde bei $\Delta int-1$ und dem „Wildtyp“ in relativ gleichem Maße amplifiziert.

Die genomische Insel Trb-1 codiert für ein funktionelles Trb/Tra Konjugationssystem und kann sowohl in andere *L. pneumophila*, als auch in andere *Legionella* Spezies transferiert

[illegible]

Abb. 31: Vergleich der Aminosäuresequenzen der ortsspezifischen Integrasen von Trb-1 (*lpc2818*) und pLP45 (*lpg1229*). Zwischen Int-1 und Lpg1229 besteht eine Homologie von 78 % (Glöckner et al., 2008). Der Sequenzvergleich erfolgte hier über ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/>).

Interessanterweise zeigte die PCR-Analyse, dass Trb-1 auch bei einem Funktionsverlust der Integrase Int-1, ortsspezifisch in das Chromosom der Transkonjuganten integrieren werden kann. Die zirkuläre episomale Form der genomischen Insel war ebenfalls detektierbar. Der Verlust der Int-1 Aktivität könnte möglicherweise durch eine Integrase des Rezipienten bzw.

der Transkonjuganten komplementiert werden. Die Aminosäuresequenz von Int-1 ist zu 78 % zur Integrase Lpg1229 von *Lp* Phil-I (Abb. 31) homolog (Glöckner et al., 2008). Darüber hinaus wird Lpg1229, wie auch Int-1, zu den P4 Phagen-ähnlichen Integrasen zugeordnet. Das Gen *lpg1229* ist auf dem Plasmid pLP45 von *Lp* Phil-1 codiert. Ähnlich zu Trb-1 existiert auch pLP45 in einer chromosomalen, innerhalb der tRNA^{Arg} integrierten und einer extrachromosomalen Form (Chien et al., 2004). Zudem wurde aufgrund der sehr ähnlichen *att* Sequenzen beider Integrasen, bereits von Glöckner und Kollegen (2008) spekuliert, dass die Mechanismen der Integration und Exzision bei Trb-1 und pLP45 ähnlich sein könnten. Ebenso könnte der Int-1 unabhängige Rekombinationsmechanismus der Integration, bei den Transkonjuganten durch die Rekombinase RecA vermittelt werden. Sowohl für die genomische Insel HPI von *Yersinia pseudotuberculosis*, als auch für das konjugative Transposon CTnPg1 von *Porphyromonas gingivalis* ist bekannt, dass die Integration der Elemente in das Genom der Rezipienten RecA-abhängig erfolgen kann (Lesic und Carniel, 2005; Naito et al., 2011). Insgesamt lassen die Ergebnisse die Schlussfolgerung zu, dass die ortsspezifische Integrase Int-1 an der Integration und Exzision von Trb-1 beteiligt ist. Es ist jedoch möglich, dass bei einer fehlenden Aktivität der Integrase, die Integration von Trb-1 in das Genom der Transkonjuganten, auch durch einen RecA-abhängigen Mechanismus erfolgen könnte.

Bei der genomischen Insel Trb-1 handelt es sich um ein integratives und konjugatives Element, das als ICE (integrative conjugative element) klassifiziert werden kann. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Exzision von Trb-1 ortsspezifisch in einem Integrase-abhängigen Prozess erfolgt. Trb-1 codiert zudem für ein funktionelles Trb/Tra Konjugationssystem, das die Konjugation der genomischen Insel in andere *Legionella* Stämme vermitteln kann. Anschließend kann Trb-1 in das Genom der Transkonjuganten innerhalb des tRNA^{Pro} Gens integriert werden (Glöckner et al., 2008). Als ICEs werden genomische Elemente bezeichnet, die durch eine ortsspezifische Exzision aus dem bakteriellen Chromosom, in eine zirkuläre und episomale Form überführt werden können. Die konjugativen Elemente können nach der Konjugation in das Genom der Transkonjuganten integriert werden. Hierbei dienen häufig tRNA Gene als Integrationsort (Bellanger et al., 2009; Boyd et al., 2009; Burrus et al., 2002).

4.1.2 Die Funktion der *Legionella vir* Region

Genomische Inseln und konjugative Elemente sind im Genus *Legionella* weit verbreitet. Ein gemeinsames Merkmal einiger dieser genomischen Inseln ist die Anwesenheit einer *Legionella vir* Region (*lvr*), welche die Gene *lvrR* oder auch *prpA* und *lvrABC* umfasst (Cazalet et al., 2004; Gomez-Valero et al., 2011). Das Trb/Tra Konjugationssystem der genomischen Inseln Trb-1 und Trb-2 ist ebenfalls mit einer *lvr*-Region assoziiert, die bei Trb-1 durch die Gene *lpc2816* bis *lpc2813* codiert wird (Glöckner et al., 2008). LvrR (*lpc2816*) ist ein putativer Phagen-Repressor, der zur Familie der HTH_XRE ähnlichen Proteine (cd00093) zugeordnet wird. Bei den Mitgliedern dieser DNA-bindenden Proteinfamilie handelt es sich um Transkriptionsregulatoren, die über eine charakteristische „Helix-turn-helix“ (HTH) Domäne verfügen. Zudem besitzt LvrR ein S24_LexA Peptidase (cd06529) ähnliches Motiv, das u. a. bei Phagen-Repressoren, wie z. B. beim Lambda Phagen-Repressor, bei Proteinen des zellulären SOS-Reparatursystems und anderen DNA-bindenden Proteinen, wie der DNA Polymerase UmuD, gefunden wird (Fernandez De Henestrosa et al., 2000; Hochschild und Lewis, 2009; Pham et al., 2001). Die Gene *lvrA* (*lpc2815*) und *lvrB* (*lpc2814*) codieren für Proteine mit unbekannter Funktion. Das Gen *lvrC* (*lpc2813*) codiert für ein Protein, das zu CsrA homolog ist. Der globale Regulator CsrA ist ein RNA bindendes Protein, das eine wichtige Funktion im biphasischen Lebenszyklus von *L. pneumophila* besitzt. Das Protein fungiert als negativer Regulator, der den Wechsel zwischen replikativer und transmissiver Phase steuert. CsrA bindet an mRNA-Moleküle und verhindert dadurch während der replikativen Phase die Expression der transmissiven Gene (Molofsky und Swanson, 2003). Durch die Analyse der $\Delta lvrRABC$ und $\Delta lvrR$ Deletionsmutanten, konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass die *lvr*-Region eine regulatorische Funktion bei der Bildung der episomalen Form von Trb-1 (Trb-1_{ci}) besitzt. Die Ergebnisse aus der PCR und qPCR lassen erkennen, dass bei beiden *lvr*-Mutanten die genomische Insel deutlich häufiger in einer episomalen Form vorlag, als beim „Wildtyp“ Stamm *Lp* Corby. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Exzision und Bildung von Trb-1_{ci} durch die *lvr*-Region negativ reguliert wird. Die Ergebnisse der PCR-Analyse zeigen, dass die negative Regulation durch die *lvr*-Region sowohl bei der *in vitro* Replikation auf BCYE-Agar, als auch bei der *in vivo* Replikation in *A. castellanii* erfolgt. Durch die Generierung und Analyse der $\Delta lvrR$ Mutante konnte zudem gezeigt werden, dass der putative Phagen-Repressor LvrR für die negative Regulation der genomischen Insel verantwortlich ist. Bei $\Delta lvrR$ lag Trb-1 im Vergleich zum „Wildtyp“, in der exponentiellen Phase um das ca. 68-fache häufiger in der episomalen Form

vor. Die qPCR-Analyse der $\Delta lvrRABC$ Mutante zeigte, dass die Expression von *int-1* (*lpc2818*) während der exponentiellen Phase ca. um das 2,6-fache signifikant hochreguliert war. Dieses Ergebnis ist konform mit der Bildung von Trb-1_{ci} bei $\Delta lvrRABC$. Im Vergleich zum „Wildtyp“, erfolgte bei der Mutante $\Delta lvrRABC$ die Bildung von Trb-1_{ci} um das ca. 147-fache häufiger. Wie bereits gezeigt werden konnte, wird die Integrase Int-1 für die Exzision der genomischen Insel benötigt. Die verstärkte Expression der ortsspezifischen Integrase in der $\Delta lvrRABC$ Mutante, könnte demnach dazu führen, dass Trb-1 häufiger in die episomale Form überführt wird. Auch die Expression von *lpc2819* war bei $\Delta lvrRABC$ ca. um das 1,9-fache hochreguliert. Das Gen *lpc2819* codiert für ein Protein mit einem Pfam_Abi_2 Motiv (pfam07751). Bei den Abi (Abortive infection) Proteinen handelt es sich um DNA-bindende Proteine, die an der Resistenzausbildung gegenüber Bakteriophagen beteiligt sind (Chopin et al., 2005). In wie weit das Genprodukt von *lpc2819* auch an der Exzision und Integration von Trb-1 beteiligt ist, wurde bisher noch nicht experimentell untersucht. Die Gene *lpc2819* und *int-1* sind im Genom von *Lp* Corby in der gleichen Orientierung codiert und das Stopcodon von *lpc2819* und das Startcodon von *int-1* werden nur durch 2 bp getrennt. Es wäre daher denkbar, dass die Gene *lpc2819* und *int-1* als polycistronische mRNA exprimiert und über einen gemeinsamen Operator reguliert werden. LvrR könnte als negativer Regulator direkt die Transkription der Gene *lpc2819* und *int-1* reprimieren. Dies hätte eine verminderte Proteinsynthese von Int-1 zur Folge, wodurch Trb-1_{ci} seltener gebildet werden würde. Alternativ könnte LvrR als positiver Regulator fungieren, der die Expression von *lvrC* aktiviert. Anschließend reguliert LvrC post-transkriptional die Expression von *lpc2819* und *int-1*, indem das CsrA Homolog an die mRNA Transkripte bindet und so die Synthese der Proteine Lpc2819 und Int-1 verhindert. Das Regulatorprotein CsrA bindet an mRNA Transkripte mit einem AGGA/TGGA Motiv in der Leader-Sequenz (Dubey et al., 2005; Liu und Romeo, 1997; Romeo, 1998). Am 5'-Ende der Nukleotidsequenz wurden bei *lpc2819* und *int-1* AGGA und TGGA Motive identifiziert, die als putative Bindestellen für das CsrA Homolog dienen könnten (Abb. 32). Die Analyse der Genexpression zeigt auch, dass beim Wildtyp *lvrC* in der postexponentiellen Phase signifikant hochreguliert war. Dies könnte möglicherweise auf eine Aktivierung durch LvrR zurückgeführt werden. Zur Überprüfung der Hypothese bezüglich der Funktion von LvrC, ist die Analyse einer $\Delta lvrC$ Deletionsmutante erforderlich. Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht eine $\Delta lvrC$ Deletionsmutante zu generieren. Bei der PCR-Kontrolle der Klone war trotz des Einbaus der Km^R-Kassette, auch das „wildtypische“ Gen detektierbar. Es wäre möglich, dass während der Klonierung in den

bakteriellen Zellen mehr als eine episomale Form von Trb-1 vorlag, wodurch nur eine partielle Deletion des Gens erfolgte.

lpc2819

ATGAAAGAAATATATTAGTGCATTATCAATAGATAGGCTTACAAGCTATGAAATATTATGTCCAAGTAAAGTGGATACGGATATTATAGGAGCTTAT
CATTTGGAAATTTATTGATAAGCCAAGCATTTTATCCCTTCATACATTCAAGTAGAAGTTGCATTACGTAATTCATTCACCACGCAGCCACCAAGAAA
TTTGAAATGAATTTTGGTTTCGATATCGTTGTAACATGATGGTAAGTCAAGATCAATCTTGAAGATACCAAAAACGATTTACATCGTAGATTTGGG
CAAGTAACAGCGTCAGACATTGTTGCAGGATTAACATTTGGATTTTGGACAAAATTAATAAAAACAAAAACATACACTGATCAATTTAATCCAAAT
CGACTATGGCCTGACTTAATTCCTTCGGTTTCCCCCATTTATGCAAGAGGGCATGATGATAGAAAGAAATATTTCCAAGCGATTTGAAGAAATAAGA
CTGATTAGAAATCGCTTGTTCATCAGAGCCTATCTGGAAATTTAAAAATGCCCAAACACCGCAAGAATGCATTGCTGAATTGCGTCGTAAGTTC
AATGACACATTTAAAGCGATTTGGCTGGATATCAAAATACAAACGAAATTTGTTAAGAGAATTTGGTTTGTGTAATCGTTAAAAACAATTGCACT
CTTGAGACCTTGGAAAGCTATAAAGTGAAGGGTGTGAAATATTACAACAATTAGCAGATTAA

int-1 (lpc2818)

ATGAAAGCAAAAATCAATAACACGCTTATTA AAAAAGCTTCTCTAGAGATAAAGAATACGAAGTTCATGATCTTGTATCTAAAAGGATTCATGATA
AGAGTTTTTCCATCAGGAACCATGCGTTACGTCTGCCAGTACAAAAGAGGCCAAAAAATTAATCTTGGAAACAGTCGGTGTATGACAGCAGCTCAA
GCTCGTGAAGGCTATTGAAGTGTAAAGTAATGCCAATAAGGGGATTGAGCCAACCGCACAAAAGGGATAAATAAGCCTAAGACACTTCAAGAA
TTTATTGAGAGTGATTATAAGCCATGGGTTTTATCAACGCATAAACGAGGTCAAGAAACGCTAGCAGGGCTTATTAGATGTTATAAGGCTTTTTTT
TCAAAGCCGTTGGGTGAAATTACGCCTGCTCTTGTAGAACAAATGGCGCGTTAAACGCTCTTAATGAAGGCACCTCTCAGGCAACCTTAATCGTAAT
ATATCCATGCTGAAATCACTGATGACCAAGGCAGTTGAATGGGGCTTTTTAAAAGAAAATGCACCTGGTAAGTTAAACCTTATAAAAATCGATCGT
TCACCTAAAATTCGATACCTGTCTATTGACAGAGAAGCAGCTTTACGCGAAGCATTAATCGAACGAGACAATCAACTCCGGCTGATGCGAAAAAAT
GGAAACCTCTGGCGAGAAAAGCGAGGTTATGATTTATTACCCGAGCTTTTCAAGAGACAATGCTTGTGATTACTTAATGCCGATGGTGTATTGTCTG
ATTAATACAGGATTAAGACGAGGCGAATTATTTCAATTGACCTGGGATATGGTGAATTTGTGAGAGGTTTCATTAATTTTGTCTGGTGAAATTACA
AAAAACAAACATCTCGTTATATCCGCTCAATGATGAGGCTTATAAAAATTTGGATAATCTGCATAAAAAAGCAGAGAGAAAAGAAGGCTTAGTT
TTTCCAAGTAAAAATCAACCATTTAACCATGTGAACGCTCATGGGGATCGTTATTGAAAAAGCGAATATTACGCAGTTTCGATGGCATGAT
TTACGACATCATTTTGCAGTAAGTTGGTGATGGCTGGGGTAGATCTAAATACCGTTCCGGAGTTATTGGGGCATCTGATATTGCCATGACGCTG
AGGTATGCGCATTTGGCGCCGGAGCATAAAGTGAATGCCGTTAGAAAAATAGATTGGTCAATGCAGGGATAG

Abb. 32: Darstellung der AGGA/TGGA Motive (grau markiert) am 5'-Ende der DNA-Sequenz von *lpc2819* bzw. *int-1 (lpc2818)* von *L. pneumophila* Corby, die als putative Bindestellen für das CsrA-homologe Protein LvrC (*lpc2813*) dienen.

Die Detektion von Trb-1_{ci} mittels qPCR, lässt bei *Lp* Corby eine geringe Zunahme der episomalen Form in der späten Wachstumsphase erkennen. Die Exzision und Bildung von Trb-1_{ci} war beim „Wildtyp“ in der stationären Phase nur um das ca. 2-fache erhöht. Eine Wachstumsabhängige Exzision, wie sie beim Plasmid ähnlichen Element pLP45 von *L. pneumophila* Paris beobachtet wurde, konnte für Trb-1 nicht festgestellt werden. Das Plasmid pLP45 codiert für das Lvh-System und existiert ähnlich wie Trb-1, in einer chromosomalen und episomalen Form, die verstärkt in der exponentiellen Phase gebildet wird (Cazalet et al., 2004; Doleans-Jordheim et al., 2006). Im Vergleich zu pLP45, erfolgt bei Trb-1 der Wechsel zwischen chromosomaler und episomaler Form nahezu unabhängig von der Wachstumsphase. Die Frage inwieweit Trb-1_{ci}, analog zu pLP45 in der bakteriellen Zelle auch in mehrfacher Kopie vorliegt, kann anhand der qPCR-Daten nicht beantwortet werden. Anders als bei pPL45, beträgt das Verhältnis von Trb-1_{ci} zum chromosomalen Gen *flaA* während der exponentiellen Phase $1,065 \times 10^{-4}:1$. Bei den beiden *lvr*-Mutanten ist das Verhältnis zwar um ein Vielfaches geringer, aber auch hier lag die Menge an Trb-1_{ci} deutlich unterhalb der des Chromosoms. Einen Hinweis, dass Trb-1_{ci} in der bakteriellen Zelle möglicherweise in

mehrfacher Kopie vorliegen könnte, liefert die PCR-Analyse von *Lp* Corby „Wildtyp“ (siehe Ergebnisse, Abb. 9C). Bei gleicher DNA-Konzentration wurde deutlich mehr PCR-Produkt für Trb-1_{ci} (2/3), als vom „intakten“ tRNA^{Pro} Gen (1/4) amplifiziert. Insgesamt ist jedoch der Mechanismus der Exzision von Trb-1 bei *Lp* Corby ein relativ seltenes Ereignis. In wie weit ein Zusammenhang zwischen der Expression der Trb-1 Gene und der Exzision der genomischen Insel besteht, ist bisher unklar. Auffällig war jedoch, dass bei der $\Delta int-1$ Mutante die Expression aller untersuchten Trb-1 Gene in der postexponentiellen Phase herunterreguliert war. Beim „Wildtyp“ wurden die Gene während der exponentiellen und postexponentiellen Phase relativ konstant exprimiert und nur drei (*lvrC*, *trbB* und *mutX*) der zehn untersuchten Gene waren hochreguliert. Bei einem Zusammenhang zwischen Genexpression und Exzision von Trb-1 sollte, basierend auf den Ergebnissen der $\Delta int-1$ Mutante, erwartungsgemäß bei $\Delta lvrRABC$ die Expression der Trb-1 Gene hochreguliert sein. Für die Mutante $\Delta lvrRABC$ war hier, mit Ausnahme der Gene *lpc2819* und *int-1*, kein eindeutiger Trend erkennbar.

4.1.3 Die Bedeutung von Trb-1 für die Fitness von *L. pneumophila* Corby

Legionella pneumophila ist ein Umweltbakterium und ein humanpathogener Erreger. In Süßwasserhabitaten dienen freilebende Protozoen für *L. pneumophila* als natürliche Wirtsorganismen und die Erreger können ebenso in Alveolarmakrophagen und humanen Monozyten effizient replizieren (Fields, 1996; Fields et al., 2002; Horwitz und Silverstein, 1980). Die Replikation erfolgt in Amöben und Makrophagen nach einem ähnlichen Mechanismus und erfordert ein funktionelles Typ IVB bzw. Dot/Icm Sekretionssystem (Andrews et al., 1998; Gao et al., 1997; Segal und Shuman, 1997). Zusätzlich zum Dot/Icm System codieren die Stämme von *L. pneumophila* und anderen *Legionella* Spezies für verschiedene Typ IVA Sekretionssysteme (Glöckner et al., 2008; Gomez-Valero et al., 2011; Segal et al., 1999). Typ IV Sekretionssysteme (T4SS) sind eng mit der bakteriellen Virulenz assoziiert und ermöglichen eine direkte Translokation von Proteinen und DNA-Molekülen in die Wirtszellen (Ding et al., 2003). Das Trb/Tra Konjugationssystem von *L. pneumophila* Corby wird als T4ASS klassifiziert und ist jeweils auf den genomischen Inseln Trb-1 und Trb-2 lokalisiert. Die Analyse von *Lp* Corby zeigte, dass Trb-1 auch während der Replikation in *A. castellanii* in einer episomalen zirkulären Form vorliegen kann. Zudem wurde bei der Mutante $\Delta lvrRABC$, in Bezug auf die episomale Form von Trb-1 (Trb-1_{ci}), *in vivo* und *in vitro*

Experimenten ein ähnlicher Phänotyp festgestellt. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Exzision und Bildung von Trb-1_{ci} bei *Lp* Corby unabhängig von einer *in vivo* und *in vitro* Replikation erfolgen kann. Lag Trb-1 größtenteils in der chromosomalen Form vor, wie dies bei der Mutante $\Delta int-1$ der Fall war, hatte dies keinen nachweisbaren Effekt auf die Replikation von *Lp* Corby in *A. castellanii*. Ebenso replizierte auch $\Delta lvrRABC$ in *A. castellanii* mit gleicher Effizienz, wie der „Wildtyp“. Die Exzision von Trb-1 hatte keinen nachweisbaren Einfluss auf die Virulenz von *Lp* Corby. Ein Zusammenhang zwischen dem Vorliegen von Trb-1 in der episomalen oder chromosomalen Form und der Virulenz von *Lp* Corby konnte experimentell nicht festgestellt werden. Vor kurzem wurde durch unsere Arbeitsgruppe die Sequenzierung des gesamten Chromosoms der *L. oakridgensis* Stämme RV2-2007 und ATCC 33761 abgeschlossen. Eine Analyse der Daten zeigte, dass der Stamm RV2-2007 ebenfalls für ein Trb-1 ähnliches Element codiert, der Stamm ATCC 33761 verfügt hingegen über ein Lvh-System (unveröffentlichte Daten). Ein Trb-1 ähnliches Element wurde beim Stamm ATCC 33761 nicht identifiziert. Interessanterweise replizieren *L. pneumophila* Corby und *L. oakridgensis* RV2-2007 deutlich effizienter in humanen Makrophagen, als der *L. oakridgensis* Stamm ATCC 33761. Durch die Konjugation von Trb-1 in den Stamm ATCC 33761, sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen der Virulenz der *Legionella* Stämme und der genomischen Insel Trb-1 untersucht werden. Eine *in vivo* Analyse der Transkonjuganten zeigte jedoch, dass der Erwerb von Trb-1 zu keiner Veränderung der Replikationsfähigkeit, der *L. oakridgensis* ATCC 33761 Transkonjuganten in humanen Makrophagen führte. Die Transkonjuganten replizierten in den Wirtszellen mit gleicher Effizienz, wie der Rezipient *L. oakridgensis* ATCC 33761. Die Ergebnisse der Replikation, können nicht auf einen unbemerkten Verlust von Trb-1 bei den Transkonjuganten zurückgeführt werden, da die genomische Insel Trb-1 auch nach zehnmaliger Passage der Transkonjuganten, nachweisbar stabil in der bakteriellen Zelle verließ. Es ist daher zu vermuten, dass die Virulenz von *Lp* Corby und *L. oakridgensis* RV2-2007 nicht von dem Besitz der genomischen Insel Trb-1 herführt. In wie weit die genomische Insel Trb-1 eine Rolle bei der Virulenz und Fitness von *L. pneumophila* Corby spielt, ist bisher nicht klar. Die Region 1/I von Trb-1 codiert für das Trb/Tra System und innerhalb der Region 1/II ist u. a. ein putatives Typ I DNA Restriktions- und Modifikationssystem (*lpc2790-2788*), eine putative Helikase (*lpc2785*), ein putativer Prolin/Betain Transporter (*lpc2782*), sowie ein Protein mit einer putativen Ca^{2+}/H^{+} Antiporter Domäne (*lpc2779*) lokalisiert (Glöckner et al., 2008). Putative Virulenzfaktoren, die auf Trb-1 codiert sind, wurden bisher nicht identifiziert. Die *trb/tra* Gene codieren für ein funktionelles Konjugationssystem bzw. T4ASS, das die

Konjugation von Trb-1 in andere *Legionella* Stämme vermitteln kann (Glöckner et al., 2008). Von D'Auria und Kollegen (2010) wurde Trb-1 als DNA Transferinsel (DT) klassifiziert (D'Auria et al., 2010). Möglicherweise handelt es sich bei Trb-1 und Trb-2 um Typ IVA Sekretionssysteme, die lediglich die eigene Translokation und möglicherweise auch die anderer genomischer Inseln vermitteln können. Bisher sind bei *Lp* Corby keine Effektorproteine oder andere Proteine bekannt, die über das Trb-1 codierte Trb/Tra System sekretiert werden. Es ist aber nicht auszuschließen, dass das Trb/Tra Konjugationssystem, ähnlich wie für das Lvh-System vermutet, auch an der Proteinsekretion beteiligt sein könnte. Experimente mit den Mutanten $\Delta dotA$, $\Delta dotB$ und den Doppelmutanten $\Delta lvh dotA$ und $\Delta lvh dotB$ deuten darauf hin, dass das Lvh-System bei *L. pneumophila* Phil-I, unter bestimmten Bedingungen, Funktionen des Dot/Icm Sekretionssystems bzw. die einiger Dot/Icm Komponenten übernehmen kann (Bandyopadhyay et al., 2007). Zudem deuten die Daten darauf hin, dass das Lvh-System während der *in vivo* Replikation der Legionellen, ebenfalls an der Vermeidung der Phagosomen-Ansäuerung beteiligt ist. Von Bandyopadhyay und Kollegen (2007) wurde daher spekuliert, dass die Sekretion von Effektorproteinen auch über das Lvh-System erfolgen könnte. Denkbar wäre, dass auch das Trb/Tra Konjugationssystem an ähnlichen Funktionen beteiligt ist, zumal *Lp* Corby über kein Lvh-System verfügt.

4.1.4 Trb-1 ist in der Gattung *Legionella* verbreitet

Die stete Zunahme an sequenzierten Genomen lässt erkennen, dass *Legionella* Stämme für eine Vielzahl an Typ IVA Sekretionssystemen und konjugativen Elementen codieren. Vor kurzem wurden einige, der im Genus *Legionella* identifizierten T4ASS bzw. Trb/Tra-Elemente, als F-Typ und P-Typ Systeme klassifiziert (Gomez-Valero et al., 2011). F-Typ T4ASS weisen eine Ähnlichkeit zur *tra*-Region der F-Plasmide von *E. coli* und *Rickettsia bellii* auf. Diese T4ASS wurden bisher in den *L. pneumophila* Stämmen Philadelphia-I (Tra5), Paris (Tra1), Lens (Tra3), Lorraine (Tra2) und bei *L. longbeachae* NSW (Tra6) gefunden. Die genomischen Inseln Trb-1 und Trb-2 von *L. pneumophila* Corby werden zu den P-Typ T4ASS gezählt. Gleichartige P-Typ Systeme sind auch in den Genomen von *L. pneumophila* Lorraine (Trb3) und *L. longbeachae* NSW150 (Trb4) lokalisiert (Gomez-Valero et al., 2011). Das Trb/Tra Konjugationssystem von Trb-1 ist funktionell und ermöglicht die Konjugation der gesamten genomischen Insel Trb-1 sowohl in andere *L. pneumophila* Stämme, als auch in andere *Legionella* Spezies, wie z. B. *L. micdadei*, *L. hakeliae* oder *L. oakridgensis* (Glöckner

et al., 2008; Lautner, 2008). Trb-1 kann über horizontalen Gentransfer übertragen werden. Es stellte sich daher die Frage nach der Verbreitung der genomischen Insel bzw. ähnlicher Elemente im Genus *Legionella*. Die bisher vollständig sequenzierten *Legionella* Genome wurden mittels *in silico* Analyse hinsichtlich Trb-1 ähnlicher Elemente untersucht. Als Kriterien dienten jeweils die Homologie der Aminosäuresequenzen der *trb/tra* codierten Proteine, der Integrationsort und die Ähnlichkeit zu Trb-1 bezüglich der genomischen Organisation. Bei *Lp* Corby ist Trb-1 innerhalb des tRNA^{Pro} Gens (*lpc2778*) integriert und codiert in der Region 1/I für alle essentiellen *trb/tra* Gene, die für einen funktionellen Konjugationsapparat erforderlich sind. Nicht-essentielle *trb/tra* Gene, wie z. B. *trbMNOP* und *traE* sind auf Trb-1 nicht lokalisiert (Glöckner et al., 2008). Aus den Ergebnissen von Glöckner et al. (2008) geht hervor, dass Trb-1 ähnliche Elemente sowohl in *L. pneumophila*, als auch in „nicht“-*pneumophila* Stämmen verbreitet sind. Bei 4 von 17 untersuchten *Lp* Stämmen und bei 6 von 15 *Legionella* Stämmen anderer Spezies, konnten mittels Southern Blot Hybridisierung die Trb-1 Gene *trbI* und *traG*, sowie die *oriT*-Region detektiert werden. Das Gen *hsdM*, das bei *Lp* Corby innerhalb der Region 1/II lokalisiert ist, wurde nur bei *Lp* S13 nachgewiesen (Glöckner et al., 2008). Die Daten aus den Sequenzierungen der Trb-1 ähnlichen Elemente von *Lp* S13 und *L. jordanis* sind konform mit den Southern Blot Analysen. Neben *Lp* S13 und *L. jordanis*, weisen die Trb-1 ähnlichen Elemente von *Lp* Alcoy (DT2) und *L. oakridgensis* RV2-2007 (LoRV-Trb-1) die höchste Übereinstimmung zur genomischen Insel Trb-1 von *Lp* Corby auf. Die Identifizierung der Trb-1 ähnlichen Elemente erfolgte bei den Stämmen *Lp* Alcoy und *L. oakridgensis* RV2-2007 anhand von *in silico* Analysen, da hier die Daten einer vollständigen Genomsequenzierung vorlagen. Die Organisation der *trb/tra* Gene ist innerhalb der Region 1/I bei den vier genannten Stämmen nahezu identisch. Unterschiede zu Trb-1 bestehen bei *Lp* Alcoy und *L. oakridgensis* RV2-2007 vor allem innerhalb der Region 1/II. Eine vollständige Sequenzierung des Trb-1 ähnlichen Elements konnte für *Lp* S13 und *L. jordanis* in dieser Arbeit nicht mehr fertiggestellt werden. Es ist jedoch zu vermuten, dass die Region 1/II zumindest bei *L. jordanis* unterschiedlich ist, da hier das Gen *hsdM* fehlt. Bei *Lp* Alcoy und *Lp* S13 ist *hsdM* vorhanden. Ebenso ist ein Teil der *hsdM* Nukleotidsequenz auch bei *L. oakridgensis* RV2-2007 codiert. Interessanterweise ist beim Stamm RV2-2007 nur das 5'Ende von *hsdM* und das 3'-Ende von *recB* codiert, dazwischen sind vier Proteine mit unbekannter Funktion codiert. Es ist wahrscheinlich, dass diese vier Gene durch ein späteres Rekombinationsereignis eingefügt wurden, wodurch auch die Unterschiede bei den einzelnen Stämmen innerhalb der Region 1/II von Trb-1 zurückgeführt werden könnten. Insgesamt lässt sich sagen, dass die genomische

Insel von den *Legionella* Stämmen vermutlich über horizontalen Gentransfer erworben wurde. Dafür würde sprechen, dass die untersuchten Trb-1 ähnlichen Elemente für alle essentiellen *trb/tra* Gene, so wie jeweils für eine ortsspezifische Integrase codieren, die zu Int-1 (*lpc2818*) homolog ist. Zudem sind die Elemente innerhalb des tRNA^{Pro} Gens integriert, was ähnliche Rekombinationsstellen bzw. *att*-Sequenzen voraussetzt. Zwischen den genomischen Inseln Trb-1 von *Lp* Corby und DT2 von *Lp* Alcoy besteht die größte Übereinstimmung hinsichtlich der Homologie der Trb/Tra bzw. Region 1/I. Dies ist nicht überraschend, da bei den *L. pneumophila* Stämmen Corby und Alcoy ca. 2.560 der Gene ihres Genoms identisch sind (D'Auria et al., 2010). Unterschiede zwischen den genomischen Inseln DT2 (39.659 bp) und Trb-1 (42.710 bp) bestehen bezüglich ihrer Größe und der Organisation der Region 1/II. Anzumerken ist hier, dass die Angaben für die Größe von Trb-1 von *Lp* Corby, die von D'Auria und Kollegen gemacht wurden, so nicht stimmen können. Laut D'Auria et al (2010) umfasst Trb-1 die Gene *lpc2779* bis *lpc2821*. Die *attR* Rekombinationsstelle befindet sich bei Trb-1 aber zwischen *lpc2819* und *lpc2820* (Glöckner et al., 2008). Für die genomische Insel DT2 von *Lp* Alcoy ist die Anzahl der angegebenen Gene korrekt, von D'Auria und Kollegen (2010) wurden bei der Angabe der Basenpaare jedoch die flankierenden *attL*- und *attR*-Sequenzen von DT2 nicht berücksichtigt. Aufgrund der nahen phylogenetischen Verwandtschaft der Stämme Corby und Alcoy und der Ähnlichkeit von Trb-1 und DT2, wird von D'Auria et al., (2010) vermutet, dass sich die beiden *Lp* Stämme das Trb/Tra System, mittels horizontalen Gentransfers, noch vor ihrer Divergenz angeeignet haben. Demnach sind die Unterschiede zwischen Trb-1 und DT2 auf spätere homologe Rekombinationsereignisse zurückzuführen. Die *Legionella* Stämme *Lp* 130b und *L. longbeachae* NSW150 verfügen ebenfalls über Trb/Tra Systeme, die auf den genomischen Elementen ROD bzw. GI-2 codiert sind (Cazalet et al., 2010; Schroeder et al., 2010). Hierbei handelt es sich ebenfalls um P-Typ T4ASS. Aber weder das Trb-System von *Lp* 130b, noch das Trb-System von *L. longbeachae* NSW150 sind in gleicher Weise zu Trb-1 ähnlich, wie dies für die genomischen Elementen von *Lp* Alcoy, *Lp* S13, *L. oakridgensis* RV2-2007 und *L. jordanis* der Fall ist. Die auf ROD und GI-2 codierte *trb/tra* Region ist nur zu ca. 76 % bzw. 75 % zu derjenigen von Trb-1 homolog. Bei der *trb/tra* Region, die auf der genomischen Insel GI-2 von *L. longbeachae* NSW150 lokalisiert ist, handelt es sich um ein Trb4-System (Gomez-Valero et al., 2011). Das genomische Element ROD von *Lp* 130b codiert hingegen höchstwahrscheinlich für ein Trb3 System. Eine „blastp“ (NCBI) Analyse der Aminosäuresequenzen der *trb/tra* Genprodukte von *Lp* 130b zeigte, dass das System durchschnittlich zu ca. 89 % zum Trb3 System von *Lp* Lorraine ähnlich ist. Die Trb3 und Trb4 Systeme verfügen, ähnlich wie Trb-1 und Trb-2,

ebenfalls über eine *oriT*-Region, die jeweils mit den Genen *traK*, *traJ* und *traI* assoziiert ist (Glöckner et al., 2008; Gomez-Valero et al., 2011). Unterschiede zwischen den Trb-Systemen von *Lp* 130b bzw. von *L. longbeachae* NSW150 zu Trb-1, bestehen sowohl hinsichtlich des Integrationsortes, als auch bei der genomische Organisation. ROD ist ein 150-kb großes Element, das innerhalb des tRNA^{Arg} Gens integriert ist (Schroeder et al., 2010). Die 106-kb große genomische Insel GI-2 liegt bei *L. longbeachae* NSW150 im tRNA^{Met} Gen integriert vor (Cazalet et al., 2010). Dies legt die Vermutung nahe, dass die auf den genomischen Elementen ROD und GI-2 codierten Trb/Tra Systeme einen anderen Ursprung haben, als das Konjugationssystem auf der genomischen Insel Trb-1.

4.2 Die genomische Insel LpcGI-2

4.2.1 Integration und Exzision von LpcGI-2

Die genomische Insel LpcGI-2 umfasst die Gene *lpc1833* bis *lpc2121* und ist im Genom von *L. pneumophila* Corby innerhalb des tRNA^{Met} Gens integriert. In der chromosomalen Form wird LpcGI-2 von den Rekombinationsstellen *attL* und *attR* (*attR-2*) flankiert. Im Unterschied zu Trb-1 und Trb-2, besteht LpcGI-2 aus zwei Elementen, A (*lpc1833* bis *lpc1888*) und B (*lpc2136* bis *lpc2121*), die durch eine *attR* (*attR-1*) Rekombinationsstelle voneinander getrennt sind. Die genomische Insel codiert für drei ortsspezifische Integrasen (*lpc1833*, *lpc1884* und *lpc2123*). Bei den LpcGI-2 codierten Integrasen handelt es sich um Tyrosin Rekombinasen der DNA_BRE_C Superfamilie (cl00213). Wichtige Merkmale dieser Rekombinasen sind ein Tyrosinrest im aktiven Zentrum und die Ausbildung der charakteristischen Holliday-Struktur während der Rekombination (Grainge und Jayaram, 1999; Grindley et al., 2006).

In dieser Arbeit konnte für LpcGI-2 zum ersten Mal gezeigt werden, dass die genomische Insel in drei verschiedenen episomalen Formen existieren kann. Eine zirkuläre episomale Form wurde sowohl jeweils für die Elemente A und B, als auch für die gesamte genomische Insel (AB) nachgewiesen. Die Integration und Exzision der Elemente A und B in das bzw. aus dem Chromosom kann demnach unabhängig voneinander erfolgen. Ebenso kann auch die gesamte genomische Insel in eine episomale Form AB überführt werden. Die drei episomalen und zirkulären Formen von LpcGI-2 liegen jedoch innerhalb der bakteriellen Zelle nicht in gleichem Verhältnis vor. Im Vergleich zu den Elementen B und AB, erfolgte die Exzision der Region *lpc1833* bis *lpc1888* und die Bildung der zirkulären Form A deutlich häufiger. Während der exponentiellen und stationären Phase betrug u. a. das Verhältnis von B:A bzw. AB:A rund $10^{-4}:1$ bis $10^{-3}:1$. Ebenso ist die Exzision der genomischen Insel LpcGI-2, ähnlich zur Bildung von Trb-1_{ci}, ein relativ seltenes Ereignis. Die Exzision und Bildung der episomalen Form A erfolgte bei *Lp* Corby unter gleichen Bedingungen in gleichem Maße, wie bei Trb-1. Die episomale Form A lag, im Vergleich zum Chromosom, in einem Verhältnis von rund $10^{-4}:1$ vor, was in etwa auch dem Verhältnis von Trb-1_{ci} zum chromosomalen Gen *flaA* entsprach. Für das Element A von LpcGI-2 konnte gezeigt werden, dass die Exzision analog zu Trb-1, ebenfalls in Abhängigkeit einer ortsspezifischen Integrase erfolgt. Die Deletion der Gene *lpc1833*, *lpc1884* und *lpc2123* ließ erkennen, dass nur die Integrase Lpc1833 an der Bildung der episomalen und zirkulären Form A beteiligt ist. Das Gen *lpc1833* ist in

unmittelbarer Nähe zur *attL* Rekombinationsstelle lokalisiert und codiert für eine P4-ähnliche Phagen- Integrase (cd00801). Phagen-Integrasen erkennen bei der Exzision und Integration von genomischen Elementen spezifische Rekombinationsstellen, die sogenannten „attachment sites“. Für die Katalyse der Exzision und/oder Integration benötigen Phagen-Integrasen, der Tyrosin Rekombinase Familie, Cofaktoren, wie z. B. das IHF (Integration host factor) Protein (Groth und Calos, 2004). Das IHF-Protein bindet die DNA Substrate an spezifischen Sequenzen, den IHF-Bindestellen (Freundlich et al., 1992; Friedman, 1988). Durch seine starken Krümmungseigenschaften bewirkt das IHF-Protein eine Krümmung der DNA und begünstigt auf diese Weise eine Interaktion von Faktoren und Regulatoren, die weiter entfernt voneinander gebunden haben (Dame et al., 2005). In der chromosomalen Form wird das Element A von der *attL* und *attR*-1 Rekombinationsstelle flankiert, zudem wurden „stromabwärts“ und „stromaufwärts“ der *att* Sequenzen DNA-Bindestellen für das IHF-Protein identifiziert. Obwohl die *attR*-1 und *attR*-2 Rekombinationsstellen nahezu identisch sind und in der Nähe der *att*-Sequenzen ebenfalls DNA-Bindestellen für das IHF-Protein lokalisiert sind, scheint die Integrase Lpc1833 nicht an der Exzision der Elemente B und AB beteiligt zu sein. Die *attR*-2 Sequenz ist zu *attL* und *attR*-1 an zwei Positionen unterschiedlich, dabei ist jeweils ein dT durch ein dC ersetzt. Integrasen binden ihre DNA Substrate sehr spezifisch. Abweichungen in den *att* Sequenzen können dazu führen, dass die Rekombination nicht vermittelt wird (Nagaraja und Weisberg, 1990). Zudem entspricht die vierte IHF-Bindestelle (AATCAATTGCTAA), die „stromaufwärts“ von *attR*-2 lokalisiert ist, an einer Position (dT→dA) nicht der postulierten IHF-Konsensussequenz. Mutationen innerhalb der IHF-Konsensussequenz können die Affinität des IHF-Proteins für sein DNA-Substrat verringern bzw. unterbinden (Hales et al., 1994). Die Frage nach der Funktion der Integrasen Lpc1884 und Lpc2123 und ihrer Beteiligung an der Exzision der genomischen Insel bleibt unklar. Anhand der Daten der PCR und qPCR-Analyse kann vermutet werden, dass die Integrasen Lpc1884 und Lpc2123 ebenfalls keinen sichtbaren Effekt auf die Exzision von Element B und der gesamten genomischen Insel (AB) haben. Das Gen *lpc1884* ist nahe der *attR*-1 Rekombinationsstelle lokalisiert und codiert für eine Phagen-Integrase (pfam12834). Die dritte Integrase Lpc2123 ist auf dem Element B, in der Nähe der *attR*-2 Sequenz codiert. Bei Lpc2123 handelt es sich um eine putative CP4-6 Integrase, die ebenso wie Lpc1833, eine Ähnlichkeit zu den P4-Integrasen der Bakteriophagen aufweist (cd00801). Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen, der von *lpc1833*, *lpc1884* und *lpc2123* codierten Integrasen, zeigte keine Homologie zwischen den Proteinen (Abb. 33). Daher ist es nicht überraschend, dass der Verlust der Lpc1833 Aktivität nicht durch die Integrase Lpc1884 oder

Lpc2123 komplementiert werden kann. Ungeachtet dessen, konnten bei der Mutante $\Delta lpc1833$, trotz der deletierten Integrase, geringe Mengen der episomalen zirkulären Form A detektiert werden. Ein Vergleich der relativen Menge der episomalen Form A mit dem chromosomalen Gen *flaA* bei $\Delta lpc1833$, lieferte ein Verhältnis von ca. $5 \times 10^{-7}:1$. Ein putatives Exzisionase ähnliches Protein, wie auf den genomischen Inseln Trb-1 bzw. Trb-2, ist auf LpcGI-2 nicht codiert. Die geringfügige Exzision und Bildung der zirkulären Form A, könnte bei $\Delta lpc1833$ durchaus auch auf eine schwache Aktivität der anderen Integrasen zurückzuführen sein. Ebenso kann zu diesem Zeitpunkt auch eine Rekombination durch eine Beteiligung von RecA nicht ausgeschlossen werden. Hierfür ist die Generierung und experimentelle Analyse einer $\Delta lpc1833\Delta recA$ Doppelmutante erforderlich. Es ist auch nicht auszuschließen, dass die Exzision und Bildung der episomalen Formen B und AB ebenfalls auf eine RecA-abhängige homologe Rekombination oder auf die eine schwache Aktivität anderer Integrasen zurückgeführt werden kann. Die Exzision und Bildung der episomalen Formen B und AB erfolgt bei *Lp Corby* relativ selten. Das Verhältnis von B bzw. AB zu *flaA* ist relativ ähnlich dem Verhältnis der episomale Form A zum chromosomalen Gen *flaA* bei der Mutante $\Delta lpc1833$.

Lpc1884	-----MSNTKLRSKAFSINELVKKAYNHSYASQSDMRHMLFRCVKDLHELG-----YKIGH	51
Lpc2123	-----	
Lpc1833	MGRKRTPGLQKRGEFWAIDKKVFGRRLCESGTGSDLEEAKEYLARRLEEIRQATVYGVPR	60
Lpc1884	IKGLKAKHIYVLVEHWKSEGKNTGT-----IKNYMAKLKRTACLLDNPKLIKPENSAINI	106
Lpc2123	-----MSDFVYVLMERR---SRNKTS-----EFVFQAES-KTGYIYEPKAVN-----	39
Lpc1833	KRNFMEAATKFLMENQHKRSLHDDAGRLRELVKYIGDMPLESIHMGALQPFVEGRRKDGV	120
	.*:*. : : : : . : .	
Lpc1884	GQRSYVSSINKAIHHIDLSR-----CTDPYIRLSLEGQMLFGLRREESMKFTLSEAHHG	160
Lpc2123	-----RVVELS-----GVPFPLPDLLR--	56
Lpc1833	STR TINHGLQVVRRIILNLAASEWMDEYGLTWIINAPKIKLLPEHDLRKPYPLNWDEQHRL	180
	: **: : : : . : : :	
Lpc1884	DSLTIKPSWTGGIGR-----TLNITNEAQRQWLTKVSQQVKTGESLIP	204
Lpc2123	-----TFATIAD-----SLDLP-----	68
Lpc1833	FNELPSHLEKMAFVNTGCRDQEICELRWDWEIKIPELSHIMVFIIPAELVKNGEERLV	240
	. . . : : . : .	
Lpc1884	SNRTYKQHLSHYEEQAKIMGVSKLHGL---RHAYAQRRYRELTQLFDLKNKGMCLCPFE-	259
Lpc2123	-----AYALKR-----LLNHKMNNDVT-	85
Lpc1833	VCNDTARSVVEEERGKHPHVFVFRGKPLARILSTGWRQARIKANLQQVRVHDLKHTFGR	300
	: . : : : : : : .	
Lpc1884	----GGKKFQNMNPIEKAMDRKARQMISLELGHSRISITRIYCG-----	299
Lpc2123	----AGYIMKDAERLRKPMQQVANFLKHIEGDNSLNMVI-----	122
Lpc1833	RLRAAGVSFEDRQDLLGHRSGRITTHYSSAELQNLDAANKVCEKQKSGVVLTLLRNPNI	360
	.* : : : : . . .	
Lpc1884	-----	
Lpc2123	-----	
Lpc1833	RMPANKQASKVVAL	374

Abb. 33: Vergleich der Aminosäuresequenzen der ortsspezifischen Integrasen Lpc1833, Lpc1884 und Lpc2123, die auf der genomischen Insel LpcGI-2 codiert sind. Die Integrasen sind zueinander nicht homolog. Der Sequenzvergleich erfolgte hier über ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/>).

Ähnlich zu Trb-1, hatte die Deletion der ortsspezifischen Integrase Lpc1833 einen deutlichen Effekt auf die Konjugationsrate von LpcGI-2. Im Vergleich zum „Wildtyp“, war bei $\Delta lpc1833$ die Konjugationsrate ca. um das 146-fache niedriger. Analog zum Donor $\Delta lpc1833$, lag auch bei den Transkonjuganten die Region *lpc1833* bis *lpc1888* (Element A) nur in der chromosomalen Form vor und die episomale zirkuläre Form A wurde nicht detektiert. Die Ergebnisse der Konjugation bestätigen, dass die Integrase Lpc1833 sowohl bei *Lp* Corby, als auch in den Transkonjuganten an der Exzision des Elements A beteiligt ist. Es ist wahrscheinlich, dass auch das Element A, ähnlich wie Trb-1, in der episomalen Form mit einer höheren Frequenz konjugiert wird. Interessanterweise waren bei den Transkonjuganten, bei denen $\Delta lpc1833$ als Donor fungierte, die chromosomalen und die episomalen Formen des Elements B und der gesamten genomischen Insel (AB) nachweisbar. Fungierte der „wildtypischen“ Stamm *Lp* Corby WT* als Donor, wurde bei den Transkonjuganten nur die episomale Form A detektiert. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die episomalen Formen A und AB auch unabhängig voneinander in andere *Legionella* Stämme transferiert werden können. Die ortsspezifische Integration von LpcGI-2 bzw. der Elemente A und B, könnte in das Genom der Transkonjuganten in einem RecA abhängigen Prozess erfolgen. Analog zu der genomischen Insel HPI von *Yersinia pseudotuberculosis* oder dem konjugativen Transposon CTnPg1 von *Porphyromonas gingivalis* (Lesic und Carniel, 2005; Naito et al., 2011).

Bei der Exzision und Bildung der episomalen zirkulären Form A, rekombinieren die *attL* und *attR-1* Rekombinationsstellen zu *attP*. Dabei verbleibt im Chromosom die *attB*-Sequenz. Interessanterweise zeigten die Ergebnisse aus der Sequenzierung, dass die Exzision des Elements A nicht immer präzise erfolgt. Beim „Wildtyp“ *Lp* Corby wurde in sechs von sieben Fällen anstelle der *attB*-Sequenz, die Rekombinationsstelle *attL* und eine variable Anzahl der von *attL* „stromabwärts“ gelegenen Basenpaare gefunden, an die sich direkt die Nukleotidsequenz des Elements B anschloss (siehe Ergebnisse 3.2.1; Abb. 20). Es ist nicht auszuschließen, dass die Ergebnisse für das PCR-Produkt 1/4 bzw. für die *attB*-Sequenz auf einen PCR-Fehler zurückzuführen sind. Andererseits ist es denkbar, dass eine unpräzise Exzision nicht durch die ortsspezifische Integrase vermittelt wird, sondern auf andere Rekombinationsmechanismen zurückzuführen ist. „Stromabwärts“ (LpcGI-2; N₅₇) von *attL* wurde die Sequenz 5'-TAAAAT-3' identifiziert. Ebenfalls „stromabwärts“ (LpcGI-2; N₅₀₈₉₆) von *attR-1* wurde die Sequenz 5'-ATTTTA-3' gefunden. Möglicherweise handelt es sich hierbei um ein „Inverted Repeat“, das während der Exzision zu unspezifischen Rekombinationsereignissen führt. Es ist zu vermuten, dass diese unpräzise Exzision nicht zur

Bildung der zirkulären Form A führt, da die *attP* Rekombinationsstelle und die benachbarten Nukleotidsequenzen in allen untersuchten Fällen immer intakt waren. Diese Theorie würde auch erklären, wieso bei der Integrase Mutante $\Delta lpc1833$ durch das Primerpaar 1/4 ein „intaktes“ tRNA^{Met} Gen amplifiziert wurde, obgleich nachweisbar fast keine Exzision des Elements A erfolgte. Ähnliche Rekombinationsereignisse wurden bei der Exzision und Bildung der episomalen Formen B und AB nicht beobachtet.

Zur Regulation der Exzision von LpcGI-2 liegen bisher noch keine experimentellen Daten vor. Ähnlich zu Trb-1, ist auf der genomischen Insel LpcGI-2 ebenfalls eine *Legionella vir* Region (*lvr*) lokalisiert. Die *lvr*-Region von LpcGI-2 codiert für einen Phagen Repressor LvrR (*lpc1857*), die Proteine LvrA (*lpc1858*) und LvrB (*lpc1859*) und das CsrA Homolog LvrC (*lpc1860*). Für Trb-1 konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Phagen-Repressor LvrR (*lpc2816*) die Exzision der genomischen Insel reguliert. Der von *lpc1857* codierte Phagen-Repressor gehört zur HTH_XRE Familie der DNA-bindenden Proteine (cd00093). Bei dem auf LpcGI-2 lokalisierten Phagen-Repressor LvrR handelt es sich, wie bei LvrR von Trb-1, ebenfalls um eine Peptidase S24 der LexA-ähnlichen Proteine (cd06529). Inwieweit LvrR die Exzision und die Bildung der drei zirkulären Formen A, B und AB bei LpcGI-2 reguliert, muss noch experimentell untersucht werden. Ebenso könnte die Exzision von LpcGI-2 auch durch weitere globale Regulationsmechanismen reguliert werden. Neuere Daten deuten darauf hin, dass die Autoinducer-Synthase LqsA und die Sensor-Kinase LqsS an der Regulation der Expression von 52 Genen, darunter auch *lvrA* (*lpg1005*) und *lvrB* (*lpg1004*) der 133-kb genomischen Insel von *Lp Philadelphia*, beteiligt sind (Tiaden et al., 2010). Die Gene *lvrA* und *lvrB* codieren für Proteine mit unbekannter Funktion, die über keine charakteristischen Motive oder Domänen verfügen. Welche Funktionen die Proteine bei der Regulation der Exzision von genomischen Elementen erfüllen ist unklar. Einen möglichen Aufschluss über die Funktion von LvrA und LvrB könnte hier die Generierung und Analyse einer $\Delta lvrA$ bzw. $\Delta lvrB$ Deletionsmutante geben.

4.2.2 LpcGI-2 codiert für ein neues und funktionelles T4SS

Legionella pneumophila codiert für verschiedene Typ IV Sekretionssysteme (T4SS). Das Dot/Icm System wird als T4BSS klassifiziert und besitzt vor allem durch den Transport von Effektorproteinen eine essentielle Rolle für die *in vivo* Replikation (Christie und Vogel, 2000; Ensminger und Isberg, 2009; Hubber und Roy, 2010). Zusätzlich codiert *Lp* Corby auf den genomischen Inseln Trb-1 und Trb-2 für ein Trb/Tra bzw. Typ IVA Sekretionssystem. Das auf Trb-1 lokalisierte Trb/Tra Konjugationssystem ist funktionell und kann den Transfer der gesamten genomischen Insel in andere *Legionella* Spezies vermitteln. Nach der Konjugation kann Trb-1 ortsspezifisch in das Chromosom der Transkonjuganten integriert werden (Glöckner et al., 2008).

Auf der genomischen Insel LpcGI-2 von *Lp* Corby ist ein neues putatives GI-T4SS lokalisiert (Schroeder et al., 2010). Die Region I (*lpc1857* bis *lpc1880*) von LpcGI-2 codiert für Proteine, die eine Homologie zu T4SS Komponenten aufweisen (Lautner, 2008; Schroeder et al., 2010). Innerhalb der Region I wurde ein VirB4 (*lpc1874*), ein TraG-N (*lpc1877*) und ein TraD (*lpc1880*) Homolog, sowie ein TraU (*lpc1875*) ähnliches Protein identifiziert. Die ATPase VirB4 (TIGR03744) ist ein DNA-bindendes Protein der PFL_4706 Proteinfamilie, die eng mit der Konjugation von DNA-Molekülen assoziiert ist (Kado, 2000; Wallden et al., 2012). Mitglieder dieser Familie werden auf Plasmiden und anderen bakteriellen genomischen Elementen gefunden (Smillie et al., 2010). Beim TraG-N (pfam07916) handelt es sich um ein Protein, das in der N-terminalen Region eine Domäne besitzt, die zur N-terminalen Region von TraG ähnlich ist. TraG ist ein Membranprotein, das eine essentielle Funktion beim DNA-Transfer spielt (Schroder und Lanka, 2003). Das von *lpc1875* codierte Protein verfügt über ein TraU Motiv (pfam06834). TraU ist an der Konjugation und an der Ausbildung der Pili beteiligt (Moore et al., 1990). Das Kopplungsprotein TraD ist eine ATPase, die an der Ausbildung der Konjugationspore beteiligt ist (pfam12696). Zusätzlich sind auf der Region I zwei Pil-Proteine codiert, PilL (*lpc1861*), ein Lipoprotein der äußeren Membran und die ATPase PilT (*lpc1874*), die am Zusammenbau und Abbau der Konjugationspili beteiligt ist (Sakai und Komano, 2002). Funktionelle Transfersysteme, die für ein GI-T4SS bzw. für ähnliche T4SS Komponenten codieren, wurden bereits für die genomischen Elemente ICEHin1056 von *Haemophilus influenzae*, ICEclc von *Pseudomonas* sp. B13, ICEPm1 von *Proteus mirabilis* und pKLC102 von *Pseudomonas aeruginosa* beschrieben (Flannery et al., 2011; Juhas et al., 2008; Juhas et al., 2007). Auf den genomischen Inseln LGI-1 und LGI-2 von *L. pneumophila* 130b wurde ebenfalls ein GI-T4SS identifiziert. Das putative T4SS von

LGI-2 ist zu ca. 87 % mit der Region I von LpcGI-2 identisch (Schroeder et al., 2010). Das putative GI-T4SS ist auf der genomischen Insel LpcGI-2 und LGI-2 jeweils mit einer *Legionella vir* Region (*lvrRABC*) assoziiert.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass innerhalb der Region I von LpcGI-2 ein funktionelles T4SS codiert ist, welches die Konjugation der genomischen Insel in *L. pneumophila* Philadelphia I vermitteln kann. Die Deletion der „Tfp pilus assembly and retraction“ ATPase PilT führte, im Vergleich zum „Wildtyp“, zu einer Reduktion der Konjugationsrate um das 148-fache. Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass LpcGI-2 in einem PilT-abhängigen Prozess konjugiert wird. Beim „Wildtyp“ betrug die Transferrate ca. 10^{-2} bis 10^{-3} . Eine ähnlich hohe Konjugationsfrequenz wurde auch für das genomische Element ICEHin1056 von *H. influenzae* beschrieben. Die Deletion einiger T4SS Komponenten, wie z. B. *pilL*, *traD*, *trbB*, *virB4* oder *pilT*, führte bei *H. influenzae* ebenfalls zu einer deutlichen Reduktion (10^{-7}) der Konjugationsrate für ICEHin1056 (Juhas et al., 2007). Ähnliche Ergebnisse wurden auch für das genomische Element ICEPm1 von *P. mirabilis* beobachtet. Durch die Deletion von *pilL* (PMI12594) wurde hier die Transferrate von ICEPm1 um das ca. 1000-fache erniedrigt (Flannery et al., 2011). Jedoch sollte bei *L. pneumophila* Corby nicht außer Acht gelassen werden, dass hier auch eine Konjugation über das Trb/Tra System möglich ist (Glöckner et al., 2008). Dies würde u. a., verglichen mit ICEHin1056, die höhere Transferrate von LpcGI-2 bei der Mutante $\Delta pilT$ erklären. Die Ergebnisse der Konjugation von LpcGI-2 deuten zudem darauf hin, dass mit Hilfe des putativen T4SS hauptsächlich das Element A (*lpc1833-lpc1888*) transferiert wird. Fungierte der „wildtypische“ Stamm *Lp* Corby WT* als Donor, wurde bei den untersuchten Transkonjuganten (TK_{WT*}) nur die chromosomale und episomale Form A detektiert. Diente die $\Delta pilT$ Mutante als Donor, konnten bei den Transkonjuganten (TK _{$\Delta pilT$}) alle drei möglichen chromosomalen und episomalen Formen von LpcGI-2 nachgewiesen werden. Hingegen wurden keine TK _{$\Delta pilT$} identifiziert, die nur die das Element A bzw. die episomale Form A von LpcGI-2 besaßen. Bei TK_{WT*} erfolgte die Selektion, auf den Kanamycin- und Streptomycin-haltigen BCYE Agarplatten, hauptsächlich auf Kolonien die das Element A erhalten haben, da dieses Element mit einer Km^R-Kassette markiert war. Das Element A lag, im Vergleich zum Element B oder der gesamten Insel LpcGI-2 (AB), deutlich häufiger in einer episomalen und zirkulären Form vor. Zudem ließ die Charakterisierung der $\Delta lpc1833$ Mutante erkennen, dass das Element A von LpcGI-2, in der zirkulären Form mit einer höheren Frequenz konjugiert wurde. Ein zu TK _{$\Delta pilT$} ähnlicher Phänotyp wurde auch für die Transkonjuganten (TK _{$\Delta lpc2123$}) aus der Konjugation mit der Integrase Mutante $\Delta lpc2123$ beobachtet. Aufgrund der Deletion von *lpc2123* durch eine

Km^R-Kassette, konnten diese TK auf das Vorhandensein von Element B bzw. der gesamten Insel LpcGI-2 (AB) selektiert werden. Dadurch sollte untersucht werden, inwieweit auch nur das Element B konjugiert werden kann. Bei den näher charakterisierten TK_{Δlpc2123} konnten alle drei chromosomalen und episomalen Formen von LpcGI-2 detektiert werden. Transkonjuganten, die nur das Element B bzw. über die episomale Form B verfügten, wurden im Rahmen der PCR-Analysen nicht identifiziert. Insgesamt lässt sich sagen, dass die Konjugation der genomischen Insel LpcGI-2 mit Hilfe des codierten T4SS erfolgt. Die Analysen der TK_{WT*} und TK_{ΔpilT} zeigten zudem, dass hauptsächlich das Element A transferiert wurde und die Konjugation dabei in Abhängigkeit der ATPase PilT erfolgte.

Mit Trb-1 konnte bereits der horizontale Transfer, mittels Konjugation, eines *oriT*-positiven Elements nachgewiesen werden. Die genomischen Inseln Trb-1 und Trb-2 von *Lp* Corby codieren jeweils für eine *oriT*-Region. Für Trb-1 ist bekannt, dass die codierte *oriT*-Region funktionell ist und nicht-mobile Plasmide mobilisieren kann (Glöckner et al., 2008). In dieser Arbeit konnte für *L. pneumophila* zusätzlich zum experimentellen Nachweis eines funktionellen T4SS, auch zum ersten Mal die Konjugation eines *oriT*-negativen Elements nachgewiesen werden. Eine *in silico* Analyse der Nukleotidsequenz von LpcGI-2 zeigte, dass auf dem genomischen Element A von LpcGI-2 keine *oriT*-Region lokalisiert ist. Konjugationsexperimente mit *Lp* Corby WT* als Donor und *Lp* Philadelphia I als Rezipient zeigten, dass das Element A bzw. die episomale Form A unabhängig von der gesamten Insel LpcGI-2, in einen anderen *Legionella* Stamm konjugiert werden kann. Das genomische Element A kann anschließend ortsspezifisch in das Chromosom der Transkonjuganten integriert werden. Auf dem Element B (Region IV) der genomischen Insel LpcGI-2 ist, ähnlich zu Trb-1 und Trb-2, ebenfalls ein TraK (*lpc2132*) codiert. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von *lpc2132* und dem auf Trb-1 codierten *traK* (*lpc2793*) zeigt nur eine Homologie von ca. 44 %. Mittels einer *in silico* Analyse wurde auf LpcGI-2, zwischen *traK* (*lpc2132*) und *lpc2131*, eine kurze DNA-Sequenz identifiziert, die in ihrer Nukleotidsequenz eine teilweise Übereinstimmung zur *oriT*-Region von Trb-1 und Trb-2 aufweist. Die identifizierte Sequenz entsprach der Bindestelle für die DNA Relaxase TraI (Abb. 34). Der Vergleich der putativen *oriT*-Region von LpcGI-2 mit der *oriT*-Region von Trb-1 lässt erkennen, dass die Region auf LpcGI-2 nicht vollständig mit der *oriT*-Sequenz übereinstimmt (Glöckner et al., 2008). Eine TraJ-Bindestelle wurde auf LpcGI-2 nicht identifiziert. In wie fern die putative *oriT*-Region funktionell ist und an der Konjugation von LpcGI-2 beteiligt ist, kann anhand der bisherigen Ergebnisse nur spekuliert werden. Eine Analyse der Transkonjuganten TK_{ΔpilT} zeigte, dass die gesamte genomische Insel LpcGI-2

(Element AB), auch trotz der deletierten ATPase PilT konjugiert werden kann. Die Ergebnisse der Konjugationsexperimente deuten darauf hin, dass PilT für die Funktionalität des T4SS von LpcGI-2 erforderlich ist. Da die Konjugationsexperimente in Anwesenheit von DNase I durchgeführt wurden, kann hier ein horizontaler Transfer über natürliche Transformation weitgehend ausgeschlossen werden. Es ist daher denkbar, dass LpcGI-2 in diesem Fall auch über ein anderes T4SS von *Lp* Corby, wie z. B. das Trb/Tra System, konjugiert werden könnte. Die Bedeutung der putativen *oriT*-Region bei diesem Prozess muss noch experimentell untersucht werden.

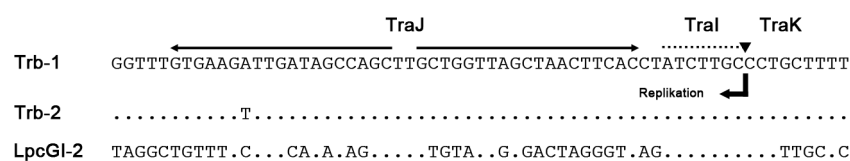


Abb. 34: Vergleich der putativen *oriT*-Region der genomischen Insel LpcGI-2, mit der *oriT*-Region der genomischen Inseln Trb-1 und Trb-2. Die putative TraJ-Bindestelle ist durch lange schwarze Pfeile und die TraI-Bindestelle ist durch eine gepunktete Linie, oberhalb der Nukleotidsequenz dargestellt. Die „nick“ Region ist durch einen kurzen schwarzen Pfeil unterhalb der DNA-Sequenz markiert. (aus Glöckner et al., 2008; modifiziert)

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die genomische Insel LpcGI-2, ähnlich zu Trb-1, ebenfalls als integratives und konjugatives Element (ICE) klassifiziert werden kann. LpcGI-2 kann ortsspezifisch aus dem bakteriellen Chromosom ausgeschnitten werden und in drei verschiedenen zirkulären episomalen Formen vorliegen. Die Exzision des Elements A von LpcGI-2 erfolgt dabei in einem Integrase-abhängigen Prozess. Zudem codiert LpcGI-2 für ein neues GI-T4SS ähnliches Typ IV Sekretionssystem, das die Konjugation der genomischen Insel in einen anderen *L. pneumophila* Stamm vermitteln kann. Nach der Konjugation kann LpcGI-2 ortsspezifisch in das Genom der Transkonjuganten integriert werden. GI-T4SS ähnliche Sekretionssysteme sind innerhalb der Proteobacteria verbreitet und wurden in Assoziation mit einer Vielzahl an genomischen Elementen identifiziert (Flannery et al., 2011; Juhas et al., 2008; Juhas et al., 2007; Schroeder et al., 2010).

4.2.3 Die Bedeutung von LpcGI-2 für die Fitness von *L. pneumophila* Corby

Mobile genomische Elemente spielen eine wichtige Rolle in der Evolution von Mikroorganismen. Neben den Hauptkomponenten, wie z. B. einer Integrase und einem konjugativen System, das den Transfer des Elements vermittelt, können genomische Inseln zusätzlich für verschiedene biologische Funktionen codieren. Diese Funktionen sind für die Mikroorganismen unter normalen Wachstumsbedingungen in der Regel nicht essentiell, können aber bei einer Veränderung der Umweltfaktoren die bakterielle Fitness erhöhen (Hacker und Carniel, 2001). Abhängig von ihrer biologischen Funktion können genomische Inseln als Pathogenitäts-, Metabolismus-, Fitness-, Resistenz- oder symbiotische Inseln klassifiziert werden (Dobrindt et al., 2004).

Die genomische Insel LpcGI-2 codiert in der Region I für ein neues Typ IV Sekretionssystem (GI-T4SS), das den Transfer der Insel in einen anderen *L. pneumophila* Stamm vermitteln kann. Auf der genomischen Insel sind drei Integrasen der DNA_BRE_C Superfamilie (cl00213) lokalisiert, die durch die Gene *lpc1833*, *lpc1884* und *lpc2123* codiert werden. Die Ergebnisse der PCR und qPCR-Analyse zeigten, dass nur die Integrase Lpc1833 an der Exzision der genomischen Insel und Bildung der episomalen Form A beteiligt ist. Mittels eines *in vivo* Experiments wurde der Frage nachgegangen, ob das Vorliegen von LpcGI-2 in der chromosomalen Form oder in der episomalen Form A, einen Einfluss auf die Replikation von *Lp* Corby in der Wirtszelle besitzt. Die *in vivo* Replikation der Integrase Mutanten $\Delta lpc1833$, $\Delta lpc1884$ und $\Delta lpc2123$ in *Acanthamoeba castellanii* zeigte keinen Unterschied zum „Wildtyp“. Demnach hat die Existenz von LpcGI-2 bzw. dem Element A in der chromosomalen oder episomalen und zirkulären Form keinen Einfluss auf die Replikation und die Virulenz von *Lp* Corby. Eine ähnliche Beobachtung wurde bereits auch für die genomische Insel Trb-1 gemacht. Inwieweit die Expression der LpcGI-2 Gene, von dem Vorliegen der genomischen Insel in der episomalen oder chromosomalen Form beeinflusst wird, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr untersucht werden. Ungeachtet dessen sind auf LpcGI-2 Genprodukte codiert, die für die Verbreitung der genomischen Insel und die Fitness von *Lp* Corby unter bestimmten Umweltfaktoren von Bedeutung sein könnten. Innerhalb der Region II ist ein Antirestriktionsprotein (*lpc1886*) der ArdA Proteinfamilie (pfam07275) codiert. ArdA verhindert nach der Konjugation, dass nichtmodifizierte Plasmide durch Restriktionsendonukleasen des Rezipienten geschnitten werden (Chilley und Wilkins, 1995; Nekrasov et al., 2007). Bei ArdA handelt es sich jedoch nicht um einen Virulenzfaktor,

das Protein ist vielmehr an der Verbreitung von konjugativen Plasmiden und anderen genomischen Elementen beteiligt. Die weiteren Gene der Region II codieren für Proteine mit bisher unbekannter Funktion. Neben Genprodukten mit ebenfalls unbekannter Funktion, ist innerhalb der Region III ein *hel*-Genlokus lokalisiert, der für die Komponenten des Cobalt/Zink/Cadmium Efflux RND Transporters codiert. Der *hel*-Genlokus umfasst die Permease HelA (*lpc1847*), das Kation Efflux System HelB (*lpc1848*) und das Außenmembranprotein HelC (*lpc1849*). In Assoziation mit dem *hel*-Lokus ist die Cadmium-Translokation P-Typ ATPase CadA (*lpc1846*) codiert, die der Familie der E1-E2_ATPasen (pfam00122) angehört. Zwei weitere putative Cadmium Efflux ATPasen werden von *lpc1843* und *lpc1842* codiert. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen zeigte, dass die drei auf LpcGI-2 lokalisierten ATPasen untereinander nicht homolog sind. Die *hel* Gene von *L. pneumophila* codieren für Proteine, die eine Ähnlichkeit zu den Transportproteinen CzcC und CnrC von *Alcaligenes eutrophus* und dem Protein NccC von *Alcaligenes xylosoxidans* besitzen (Arroyo et al., 1994; Liesegang et al., 1993). Substrate, die bei *L. pneumophila* mittels des Hel Efflux RND Transporters transportiert werden, wurden bisher nicht identifiziert. Es wurde jedoch festgestellt, dass eine Deletion der *hel* Gene bei *L. pneumophila* eine Reduktion der Zytotoxizität gegenüber humanen Makrophagen (U-937) zur Folge hat (McClain et al., 1996). Qin und Kollegen (2007) spekulierten, dass die Hel Proteine möglicherweise am Export von Schwermetallionen aus der bakteriellen Zelle beteiligt sind, da *Legionella* überwiegend in Süßwasserhabitaten und im Erdreich verbreitet ist. Die Hel Proteine könnten auf diese Weise *L. pneumophila* eine Resistenz gegenüber Schwermetallen vermitteln und unter bestimmten Bedingungen die bakterielle Fitness erhöhen. Bei *L. dumoffii* TEX-KL ist der *hel*-Genlokus auf dem Plasmid pLD-TEX-KL codiert. Untersuchungen deuteten darauf hin, dass ein TEX-KL Stamm, der für das Plasmid negativ war, im Vergleich zum „Wildtyp“ eine höhere Sensitivität gegenüber Cadmium aufwies (Qin et al., 2007). Des Weiteren ist innerhalb der Region II von LpcGI-2 ein lypolytisches Enzym (*lpc1837*) der Alpha/Beta Hydrolase Proteinfamilie (pfam12697) codiert, sowie ein Prolin/Betain Transporter ähnliches Protein (*lpc1835*) der MFS (Major Facilitator Superfamily) Proteinfamilie (cd06174). Bei der MFS Proteinfamilie handelt es sich um eine Gruppe sekundärer Transporter, die die Uniporter, Antiporter und Symporter umfasst. Diese Transportproteine besitzen eine Funktion bei der Nährstoffaufnahme oder könnten als Efflux Pumpen fungieren, die u. a. für die Antibiotikaresistenz von Bedeutung sein können. Für die Pathogenität von *L. pneumophila* ist in erster Linie das Dot/Icm System von Bedeutung (Andrews et al., 1998; Segal und Shuman, 1997). Bei der Aufnahme und während der Replikation in Amöben, wie z. B. *A. castellanii*,

oder Alveolarmakrophagen, werden über dieses Typ IVB Sekretionssystem eine Vielzahl an Effektorproteinen in die Wirtszelle transferiert (Ensminger und Isberg, 2009). Auf der genomischen Insel LpcGI-2 sind innerhalb der Region IV bzw. dem Element B zwei putative Dot/Icm Effektorproteine codiert. Das Gen *lpc2130* codiert für ein putatives Effektorprotein, das bisher nicht näher charakterisiert wurde und eine Ähnlichkeit zu *lpw_25801* von *Lp* 130b aufweist. Der zweite Dot/Icm Effektor wird von *lpc2128* codiert und zeigt in seiner Aminosäuresequenz eine Ähnlichkeit zum SidC Homolog von *L. longbeachae* NSW150. Nach der Phagozytose der Legionellen durch die Wirtszellen und Bildung der LVC (*Legionella* containing region), ist SidC an der Rekrutierung der Vesikel des Endoplasmatischen Retikulums beteiligt (Ragaz et al., 2008). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es sich bei LpcGI-2 vermutlich nicht um eine Pathogenitätsinsel handelt. Dennoch ist zu vermuten, dass der auf LpcGI-2 lokalisierte HelABC Efflux Transporter für Schwermetallionen, *Lp* Corby unter bestimmten Umweltbedingungen einen Vorteil verschaffen könnte.

4.2.4 LpcGI-2 ähnliche genomische Inseln sind in der Gattung *Legionella* verbreitet

Typ IV Sekretionssysteme (T4SS) werden anhand von Kriterien, wie z. B. der genomischen Organisation der codierten Mobilitätsgene, bestehender Homologien und ihrer evolutionären Verwandtschaft in F-Typ, P-Typ, I-Typ und GI-T4SS klassifiziert (Juhas et al., 2008; Juhas et al., 2007). Die F und P-Typ Systeme werden durch ihre Ähnlichkeit zum *vir*-System von *Agrobacterium tumefaciens*, zu den T4ASS zugeordnet. F-Typ T4SS zeichnen sich durch eine Homologie zur *tra*-Region des F-Plasmids von *E. coli* bzw. zur *tra*-Region von *Rickettsia bellii* aus (Frost et al., 1994; Ogata et al., 2006). Bei *Legionella* werden z. B. die Tra-Systeme von *L. pneumophila* Philadelphia-I und *L. longbeachae* NSW150 als F-Typ T4SS klassifiziert. Das jeweils auf Trb-1 und Trb-2 codierte Trb/Tra Konjugationssystem von *L. pneumophila* Corby wird hingegen zu den P-Typ T4SS gezählt (Glöckner et al., 2008; Gomez-Valero et al., 2011). P-Typ T4SS sind homolog zum Konjugationssystem von *P. aeruginosa* (Gomez-Valero et al., 2011). Als Prototyp für ein I-Typ T4SS gilt das Dot/Icm System von *L. pneumophila*, das auch als Typ IVB Sekretionssystem bezeichnet wird und u. a. auch bei *Coxiella burnetii* identifiziert wurde (Segal et al., 2005). Die vierte Gruppe der T4SS, die sogenannten GI-T4SS, sind bei Proteobacteria weit verbreitet und liegen in der Regel in Assoziation mit

genomischen Elementen vor (Juhas et al., 2007). Das neue GI-T4SS wurde bereits für eine Vielzahl von Bakterien, darunter *Haemophilus influenzae*, *Proteus mirabilis* und *Legionella pneumophila* beschrieben (Flannery et al., 2011; Juhas et al., 2007; Schroeder et al., 2010). Die genomischen Inseln LpcGI-1 und LpcGI-2 von *Lp* Corby codieren ebenfalls für ein GI-T4SS (Schroeder et al., 2010).

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass das auf LpcGI-2 lokalisierte GI-T4SS bei *Lp* Corby funktionell ist und die Konjugation der genomischen Insel in einen anderen *L. pneumophila* Stamm vermitteln kann. Neben dem Nachweis der Funktionalität, stellte sich die Frage nach der Verbreitung von LpcGI-2 bzw. ähnlichen genomischen Inseln im Genus *Legionella*. Bisher sequenzierte *Legionella* Genome wurden mittels *in silico* Analyse auf das Vorkommen von LpcGI-2 ähnlichen genomischen Inseln untersucht. Als Kriterien für die Klassifizierung als LpcGI-2 ähnliches Element, diente der Integrationsort, die Homologie der GI-T4SS Komponenten und die genomische Organisation der Inseln. Die genomische Insel LpcGI-2 ist im Genom von *Lp* Corby innerhalb des tRNA^{Met} (*lpc1832*) integriert und codiert in der Region I für die Komponenten des GI-T4SS. Der *L. pneumophila* Stamm Paris codiert für eine LpcGI-2 ähnliche genomische Insel (LppGI-2). Die 130-kb große genomische Insel LppGI-2 besitzt den gleichen Lokalisationsort wie LpcGI-2 und ist im Genom von *Lp* Paris ebenfalls innerhalb des tRNA^{Met} Gens lokalisiert (Cazalet et al., 2004). Analog zur genomischen Insel von *Lp* Corby, wurde auf dem 130-kb Element von *Lp* Paris ein Cluster von 24 Genen (*lpp2375* bis *lpp2398*; Region I) identifiziert, das für die Komponenten des GI-T4SS codiert (Schroeder et al., 2010). Die auf LpcGI-2 und LppGI-2 lokalisierten GI-T4SSs besitzen eine identische genomische Organisation. Zudem weisen die codierten T4SS Proteine eine relativ hohe Homologie auf. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der codierten Genprodukte, zeigte eine Übereinstimmung von durchschnittlich 97 %. Darüber hinaus wurden in den Regionen II, III und IV auf beiden genomischen Inseln Gene identifiziert, die für homologe Proteine codieren. Unterschiede zwischen LpcGI-2 und LppGI-2 bestehen in erster Linie innerhalb der Regionen III. Die genomische Insel von *Lp* Paris codiert in dieser Region für chemiosmotische Efflux Systeme (*cebABC*, *cecABC*), mehrere ATP-abhängige Effluxpumpen (*cadA1*, *ctpA*, *copA1*, *copA2*) und eine für eine ATP-Synthase (Cazalet et al., 2004). Unterschiede innerhalb der Region III sind bei LpcGI-2 und LppGI-2 vermutlich auf Rekombinationsereignisse, wie Insertion oder Deletion zurückzuführen. Aufgrund bestehender Homologien zwischen den Genprodukten von *lpc1839* und *lpp2318*, sowie *lpc1841* und *lpp2368* ist zu vermuten, dass die Gene *lpp2319* bis *lpp2367* über homologe Rekombination, in die Region zwischen *lpp2318* und

lpp2368 inseriert wurde. Ähnlich zu LpcGI-2 wurden für die chromosomale Form der genomischen Insel von *Lp Paris* ebenfalls eine *attL* und zwei *attR* Rekombinationsstellen identifiziert. LppGI-2 besteht demzufolge aus zwei Elementen, die jeweils die Gene *lpp2311* bis *lpp2409* (Region I-III), sowie *lpp2410* bis *lpp2439* (Region IV) umfassen. Es ist bisher nicht bekannt, ob die genomische Insel LppGI-2, ähnlich wie LpcGI-2, auch in einer oder mehrerer episomalen Formen vorliegen kann. LppGI-2 codiert ähnlich wie die genomische Insel von *Lp Corby* für drei putative Integrasen, von denen jedoch nur die Genprodukte von *lpp2312* bzw. *lpp2404* zu denjenigen von *lpc1833* bzw. *lpc1884* codierten Proteinen homolog sind. Die auf den genomischen Inseln jeweils innerhalb der Region IV von *lpp2429* und *lpc2123* codierten putativen Integrasen, weisen hingegen in ihren Aminosäuresequenzen keine Übereinstimmung auf. In Anbetracht der identischen *attL* und *attR* Rekombinationsstellen (Abb. 35) und der bestehenden Homologie von *lpp2312* zu *lpc1833*, ist es denkbar, dass die Integrase Lpp2312 an der ortsspezifischen Exzision des Elements *lpp2311* bis *lpp2409* von LppGI-2 beteiligt sein könnte.

<i>Lp Corby</i> - tRNA ^{Met}	GGGCCCATAGCTCAGTTGGTCAGAGCAGCGGA <u>CTCATAATCCGTTGGTCCTAGGTTCAAGTCCTAGTGGGCCACCA</u>
<i>Lp Paris</i> - tRNA ^{Met}	GGGCCCATAGCTCAGTTGGTCAGAGCAGCGGA <u>CTCATAATCCGTTGGTCCTAGGTTCAAGTCCTAGTGGGCCACCA</u>
<i>Lp 130b</i> - tRNA ^{Arg}	GCGCTCGTAGCTCAGCTGGATAGAGTACTTGGCTTCGAACCAAGGTGTCGGGGGTTTCGAGTCCCTCCGAGCGGCCA
<i>Lp Corby</i> - tRNA ^{Thr}	GCCGTTGTAGCTCAGTTGGTAGAGCAATTGATTCGTAATCAAGAGGTCGGAGGTTCGACTCCTCTCAGCGGCA

Abb. 35: Vergleich der tRNA Gene, die als Integrationsorte für genomische Inseln mit einem GI-T4SS dienen. Innerhalb des tRNA^{Met} Gens von *Lp Corby* ist die genomische Insel LpcGI-2 und innerhalb des tRNA^{Met} Gens von *Lp Paris* ist das 130-kb Element LppGI-2 integriert. Das tRNA^{Arg} Gen von *Lp 130b* dient als Integrationsort für LGI-2. Die genomische Insel LpcGI-1 von *Lp Corby* ist innerhalb des tRNA^{Thr} Gens lokalisiert. Markiert sind jeweils die Nukleotidsequenzen der *attL* Rekombinationsstellen (unterstrichen) und identische Nukleotide (rot) zur tRNA^{Met} von *Lp Corby* innerhalb dieser Sequenz.

Das genomische Element LGI-2 von *Lp 130b* codiert für Gene bzw. Regionen, die eine Ähnlichkeit zur genomischen Insel LpcGI-2 von *Lp Corby* aufweisen. Auf LGI-2 ist ebenfalls ein GI-T4SS lokalisiert, bestehend aus einem Cluster mit 24 Genen, die durchschnittlich zu 87 % mit der Region I (*lpc1857* bis *lpc1880*) der genomischen Insel von *Lp Corby* identisch sind (Schroeder et al., 2010). Obwohl bei LpcGI-2 und LGI-2 die flankierenden Regionen weitgehend divers sind, wurden auf beiden genomischen Inseln innerhalb der Region II und III Gene identifiziert, die für homologe Proteine codieren. Allerdings sind der Integrationsort im Chromosom (Abb. 35), sowie die genomische Organisation von LpcGI-2 und LGI-2 unterschiedlich. LGI-2 ist Teil des genomischen Elements 150-kb ROD, das innerhalb des tRNA^{Arg} Gens lokalisiert ist. Das Element 150-kb ROD codiert zusätzlich für ein Trb-System

bzw. ein T4ASS (Schroeder et al., 2010). Die genomische Insel LGI-2 von *Lp* 130b codiert zwar für ein ähnliches GI-T4SS, wie LpcGI-2, weist aber im Vergleich zu LppGI-2 insgesamt eine deutlich geringere Übereinstimmung mit der genomischen Insel von *Lp* Corby auf (siehe Ergebnisse 3.2.5; Abb. 27). Im Genom von *Lp* Corby wurde eine zweite genomische Insel (LpcGI-1) identifiziert, auf der ebenfalls ein GI-T4SS lokalisiert ist. LpcGI-2 und LpcGI-1 codieren jedoch nicht für ein identisches GI-T4SS (Schroeder et al., 2010). Die von LpcGI-1 codierten GI-T4SS Komponenten besitzen nur eine geringe Homologie (durchschnittlich ca. 52 %) zu denjenigen von LpcGI-2. Mit Ausnahme der Gene *lpc2377* bis *lpc2362*, die u. a. für ein homologes HelABC Efflux Transportsystem codieren, wurden beim Vergleich der Region II, III und IV von LpcGI-2 mit LpcGI-1, keine Genprodukte mit hoher Homologie identifiziert. Ebenso sind die genomische Organisation und der chromosomale Integrationsort von LpcGI-1 unterschiedlich zu LpcGI-2. Im Genom von *Lp* Corby ist LpcGI-1 innerhalb des tRNA^{Thr} Gens lokalisiert (siehe Ergebnisse 3.2.5; Abb. 27). Ähnlich zu LpcGI-2 besteht auch LpcGI-1 aus zwei Elementen. Für LpcGI-1 wurden ebenfalls eine *attL* und zwei *attR* Rekombinationsstellen identifiziert, die jedoch nicht mit den *att*-Sequenzen von LpcGI-2 identisch sind (Abb. 35). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es sich bei LpcGI-1 nicht um eine LpcGI-2 ähnliche genomische Insel handelt. Der Stamm *L. pneumophila* 570-CO-H (ATCC 43290; Serogruppe 12) codiert für eine Region (*lp12_2057* bis *lp12_2104*), die ähnlich zur genomischen Insel LpcGI-2 ist. Innerhalb dieser LpcGI-2 ähnlichen Region, ist ein GI-T4SS lokalisiert, das zum 24-Gencluster von LpcGI-2 durchschnittlich zu ca. 98 % ähnlich ist. Bei der LpcGI-2 ähnlichen Region von *L. pneumophila* 570-CO-H handelt es sich weder um eine genomische Insel, noch gibt es Hinweise dafür, dass die genannte Region Teil einer solchen ist. Für die Klassifizierung als genomische Insel fehlen zwei charakteristische Merkmale, zum einen die Integration in ein tRNA Gen und zum anderen die flankierenden Rekombinationsstellen *attL* und *attR* (Hacker et al., 1997).

Insgesamt ist zu vermuten, dass die genomischen Inseln LpcGI-2, LppGI-2 und die homologe Region im Stamm *L. pneumophila* 570-CO-H für ein gleiches GI-T4SS codieren und einen gemeinsamen Ursprung haben müssen. Die Stämme erhielten die genomischen Inseln höchstwahrscheinlich über horizontalen Gentransfer. Interessanterweise codiert der *L. pneumophila* Stamm Alcoy für kein LpcGI-2 ähnliches Element, obwohl die *Lp* Stämme Alcoy und Corby phylogenetisch näher verwandt sind als die Stämme *Lp* Corby und *Lp* Paris (D'Auria et al., 2010). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die genomischen Inseln von *Lp* Corby und *Lp* Paris unabhängig voneinander, vermutlich nach der Diversität der beiden Stämme, erworben wurden. Die genomischen Inseln LpcGI-2 von *Lp* Corby und LGI-2 von

Lp 130b codieren für ein ähnliches GI-T4SS, weisen aber Unterschiede hinsichtlich des chromosomalen Integrationsortes, sowie der genomischen Organisation auf (Schroeder et al., 2010). Dieses Ergebnis lässt die Schlussfolgerung zu, dass LpcGI-2 und LGI-2 vermutlich keinen gemeinsamen Ursprung haben und bestehende Homologien auf spätere Rekombinationsereignisse zurückzuführen sind. Aufgrund der geringen Identität zwischen LpcGI-2 und LpcGI-1 ist es wahrscheinlich, dass die genomischen Inseln über horizontalen Gentransfer unabhängig voneinander von *Lp* Corby aufgenommen wurden.

4.3 *L. pneumophila* Corby codiert für sechs genomische Inseln

Im Genom von *L. pneumophila* Corby sind sechs genomische Inseln bzw. Elemente lokalisiert. Für die genomischen Inseln Trb-1 und Trb-2 wurde von unserer Arbeitsgruppe erstmals ein neues Trb/Tra Konjugations- und Typ IVA Sekretionssystem beschrieben (Glöckner et al., 2008). Neben den genomischen Inseln LpcGI-1 und LpcGI-2, die für ein neues putatives T4SS codieren, wurden in dieser Arbeit im Genom von *Lp* Corby die genomischen Elemente LpcGI-Asn und LpcGI-Phe identifiziert und analysiert.

4.3.1 Die genomischen Insel LpcGI-1

Bei LpcGI-1 handelt es sich um ein ca. 120-kb großes genomisches Element, das im Chromosom von *L. pneumophila* Corby innerhalb des tRNA^{Thr} Gens integriert ist. Die genomische Insel LpcGI-1, ähnelt in ihrem genomischen Aufbau LpcGI-2 und besteht ebenfalls aus zwei Elementen, A (*lpc2314* bis *lpc2204*) und B (*lpc2203* bis *lpc2190*). Zwischen den Elementen A und B wurde die Rekombinationsstelle *attR*-1 identifiziert. In der chromosomalen Form wird LpcGI-1 von den Rekombinationsstellen *attL* und *attR*-2 flankiert. In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die genomische Insel LpcGI-1 sowohl als chromosomale Form, als auch in zwei episomalen Formen (A und B) existieren kann. Die Ergebnisse der PCR-Analyse zeigen, dass die Exzision der Elemente A und B unabhängig voneinander erfolgt. Eine episomale Form AB, wie bei LpcGI-2, wurde bei LpcGI-1 nicht detektiert. Es ist gut möglich, dass hier keine Exzision der gesamten genomischen Insel stattfindet und daher auch keine episomale und zirkuläre Form AB gebildet wird. Die Ergebnisse aus der PCR-Analyse deuten darauf hin, dass die episomalen Formen A und B in relativ gleichem Verhältnis vorliegen. Ebenso wäre es denkbar, dass bei LpcGI-1 die Bildung einer episomalen Form AB nur in sehr geringen Maße erfolgt und daher mittels PCR nicht nachweisbar ist. Für die genomische Insel LpcGI-2 konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass nur die Exzision und Bildung der episomalen Form A durch eine ortsspezifische Integrase (*lpc1833*) katalysiert wird. Die Exzision von LpcGI-1 könnte wahrscheinlich auch in Abhängigkeit einer oder mehrerer ortsspezifischer Integrasen erfolgen. LpcGI-1 codiert für drei putative Integrasen (*lpc2307*, *lpc2204*, *lpc2190*), die der Superfamilie der DNA_{BRE}-C (cl00213) Proteine angehören. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen zeigte jedoch keine Homologie zwischen den LpcGI-1 codierten

Integrasen. Das Genprodukt von *lpc2307* ist ähnlich zu den Phagen-Integrasen der Integrase_1 Proteinfamilie (pfam12835). Die Gene *lpc2204* und *lpc2190* codieren jeweils für eine P4-ähnliche Phagen-Integrase (cd00801). Bei den putativen Phagen-Integrasen handelt es sich um Tyrosin Rekombinasen. Ähnlich zu LpcGI-2, wurden auch auf der genomischen Insel LpcGI-1, putative DNA-Bindestellen für den Integrase Cofaktor IHF (Integration host factor) identifiziert. Die IHF-Bindestellen befinden sich in unmittelbarer Nähe der *attL* und *attR* Sequenzen, bzw. in Assoziation mit den Rekombinationsstellen. Es muss noch experimentell untersucht werden, in wieweit die putativen Integrasen funktionell sind und welche der Integrasen an der Exzision von LpcGI-1 beteiligt ist.

Auf der genomischen Insel LpcGI-1 ist zudem eine *Legionella vir* Region lokalisiert, welche die Gene *prpA* (*lpc2273*), *lvrA* (*lpc2274*), *lvrB* (*lpc2275*) und *lvrC* (*lpc2276*) umfasst. Das Gen *prpA* codiert für einen Phagen-Repressor und ist auch unter der Bezeichnung *lvrR* bekannt. Im Gegensatz zum LvrR Phagen-Repressor, der auf Trb-1 und LpcGI-2 codiert ist, besitzt das von LpcGI-1 codierte Protein kein S24_LexA Peptidase ähnliches Motiv. Das Gen *lpc2273* codiert für ein 84 Aminosäuren (AS) langes Protein. Die auf Trb-1 und LpcGI-2 lokalisierten *lvrR* Gene codieren hingegen für 224 bzw. 220 AS lange Produkte. Demzufolge ist das Genprodukt von *lpc2273* vermutlich nicht funktionell. Für Trb-1 konnte bereits die LvrR-abhängige Regulation der Exzision nachgewiesen werden. Bedingt durch den nicht-funktionellen Phagen-Repressor, könnte vermutlich eine ähnliche Regulation bei LpcGI-1 fehlen. Dieser Befund würde bei LpcGI-1 auch die relativ häufige Exzision und Bildung der episomalen Formen A und B erklären, was in etwa der Menge an episomalem Trb-1 bei der $\Delta lvrR$ Mutante in der PCR-Analyse entspricht.

Auf der genomischen Insel LpcGI-1 ist ein putatives neues Typ IV Sekretionssystem (GI-T4SS) lokalisiert. Das 24-Gencluster ist homolog zum GI-T4SS, das auf der genomischen Insel LGI-1 von *Lp* 130b codiert ist (Schroeder et al., 2010). Das GI-T4SS von LpcGI-1 codiert ähnlich wie LpcGI-2, ebenfalls für ein VirB4 (*lpc2290*), TraD (*lpc2296*), TraG-N (*lpc2293*), PilL (*lpc2277*) und PilT (*lpc2292*) homologes Protein. Zudem besitzen die Gene des putativen T4SS von LpcGI-1 und LpcGI-2 eine ähnliche genomische Organisation. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass auf LpcGI-2 ein funktionelles Konjugationssystem lokalisiert ist, das den Transfer der genomischen Insel in andere *L. pneumophila* Stämme vermitteln kann. In wie fern auch LpcGI-1 für ein funktionelles T4SS codiert, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr untersucht werden. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass die genomische Insel mobil ist und von *Lp* Corby über horizontalen Gentransfer erworben wurde. Die Analyse von insgesamt 217 *L. pneumophila* und 32 „nicht“-

pneumophila Genomen lässt erkennen, dass die 100-kb Region von *Lp* Philadelphia-I im Genus *Legionella* weit verbreitet ist (Cazalet et al., 2008; Chien et al., 2004). Das 100-kb Element ist ebenfalls mit einem GI-T4SS assoziiert, das zu den T4SS von LpcGI-1 und LGI-1 homolog ist (Schroeder et al., 2010). Eine *in silico* Analyse der bisher sequenzierten *Legionella* Genome zeigte, dass LpcGI-1 ähnliche genomische Elemente in allen untersuchten *L. pneumophila* Stämmen vorhanden waren (Tab. 18). Alle diese genomischen Elemente sind innerhalb eines tRNA^{Thr} Gens lokalisiert und codieren für homologe GI-T4SS Komponenten. Unterschiede bestehen zwischen den genomischen Inseln hinsichtlich der Größe und der genomischen Organisation. Diese Unterschiede beruhen höchstwahrscheinlich auf homologen Rekombinationsereignissen, die durch eine Insertion oder Deletion von einzelnen oder mehreren Genen zustande gekommen sind.

Tab. 18: Die Verbreitung von LpcGI-1 bzw. ähnlichen genomischen Insel im Genus *Legionella*.

Stamm	ähnlich zu LpcGI-1	tRNA	Genregion	<i>attR-1</i>	<i>attR-2</i>	Größe [bp]
<i>L. pneumophila</i> Corby	+	Thr	<i>lpc_2190-2314</i>	+	+	120.190
<i>L. pneumophila</i> Phil-I	+	Thr	<i>lpg_0973-1085</i>	+	+	114.595
<i>L. pneumophila</i> Paris	+	Thr	<i>lpp_1034-1088</i>	+	-	44.537
<i>L. pneumophila</i> Lens	+	Thr	<i>lpl_1001-1085</i>	+	+	79.772
<i>L. pneumophila</i> Alcoy	+	Thr	<i>lpa_01465-01658</i>	+	-	132.991
<i>L. pneumophila</i> 130b	+	Thr	<i>lpw_10581-11301</i>	+	-	59.600
<i>L. pneumophila</i> 570-CO-H	+	Thr	<i>lp12_0995-1062</i>	+	+	57.656

Zusätzlich zu den Mobilitätsgenen des GI-T4SS und den putativen Integrasen, codiert die genomische Insel LpcGI-1 für biologische Funktionen, die sich unter bestimmten Umweltbedingungen, wie z. B. in Anwesenheit toxischer Substanzen, vorteilhaft auf das Wachstum von *L. pneumophila* auswirken könnten. Auf LpcGI-1 ist innerhalb der Region III ein putatives Schwermetallionen Transportsystem (*helABC*), die chemiosmotischen Efflux Systeme *cebABC* und *cecABC*, mehrere ATP-abhängige Effluxpumpen (*cadA*, *ctpA*, *copA1*, *copA2*), sowie eine ATP-Synthase lokalisiert. Homologe Efflux Systeme und Pumpen wurden u. a. auch auf dem 100-kb Element von *Lp* Philadelphia-I und der 130-kb Insel (LppGI-2) von

Lp Paris identifiziert (Cazalet et al., 2004; Chien et al., 2004). Zur Funktion der sogenannten „Efflux-Inseln“ ist bisher nur wenig bekannt. Von Chien und Kollegen wurde bereits spekuliert, dass diese „Efflux-Inseln“ das Wachstum von *L. pneumophila* in Wasserrohrsystemen begünstigen könnten und die Replikation der Bakterien in Anwesenheit von toxischen Bioziden erlauben (Chien et al., 2004). Erste Untersuchungen zeigten zudem, dass die Genexpression der oben genannten Efflux Systeme und Efflux Pumpen während der Replikation von *L. pneumophila* in Makrophagen induziert ist (Rankin et al., 2002). Interessanterweise sind die auf LpcGI-1 codierten Genprodukte von *helA* (*lpc2269*), *helB* (*lpc2270*), *helC* (*lpc2271*) und *cadaA* (*lpc2268*) zu 94 bis 99 % zu den HelABC Proteinen und der ATPase CadA identisch, die auf LpcGI-2 und den 100-kb bzw. 130-kb Elementen der Stämme Philadelphia bzw. Paris codiert sind. Eine ähnliche *hel*-Region ist auch auf dem 66-kb Plasmid pLD-TEX-KL von *L. dumoffii* TEX-KL präsent (Qin et al., 2007). Wie bereits für LpcGI-2 und pLD-TEX-KL spekuliert, könnte der auf LpcGI-1 lokalisierte Cobalt/Zink/Cadmium Efflux RND Transporter HelABC auch am Export von Schwermetallionen beteiligt sein. Trotz allem, Untersuchungen zeigten, dass die von *L. pneumophila* Philadelphia codierten Efflux Systeme und Pumpen keinen nachweisbaren Effekt auf die Replikation der Bakterien in Amöben und humanen Makrophagen haben. Nur die Kupfer Efflux ATPase *copA1* (*lpg1024*) wurde als funktionelles Protein identifiziert, das eine Resistenz gegenüber Cu^{2+} Ionen vermittelt (Kim et al., 2009). Das Genprodukt von *lpg1024* ist zu ca. 85 % zur LpcGI-1 codierten Kupfer Efflux ATPase *copA1* (*lpc2254*) identisch. Inwieweit die Efflux Systeme und ATPase Pumpen auch bei *L. pneumophila* Corby funktionell sind, wurde bisher noch nicht untersucht. Aufgrund der bestehenden Homologien zwischen den von LpcGI-1 und vom 100-kb Element codierten Efflux Systemen, ist zu vermuten, dass die „Efflux-Insel“ von *Lp* Corby für die Replikation in Amöben und humanen Makrophagen nicht essentiell ist. Dennoch, Kim und Kollegen (2009) vermuten, dass die „Efflux-Insel“ bei *Legionella* in einem anderen Stadium des Lebenszyklusses eine Rolle spielen könnte. Möglicherweise könnte die „Efflux-Insel“ den Effekt der Ag/Cu Ionisation reduzieren, die in den Wassersystemen der Krankenhäuser ein Wachstum der Legionellen verhindern soll (Kim et al., 2009; Stout und Yu, 2003).

4.3.2 Die genomische Insel LpcGI-Asn

Das genomische Element LpcGI-Asn wurden während dieser Arbeit, im Zuge einer systematischen *in silico* Analyse der tRNA Gene von *L. pneumophila* Corby identifiziert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es sich bei LpcGI-Asn um eine genomischen Insel handelt. LpcGI-Asn kann durch die Größe von nur rund 6 kb, auch als Islet klassifiziert werden (Hacker und Carniel, 2001). Die genomische Insel ist innerhalb des tRNA^{Asn} Gens lokalisiert. Die Ergebnisse aus der PCR-Analyse und der Sequenzierung zeigen, dass LpcGI-Asn sowohl in einer episomalen zirkulären, als auch in einer chromosomalen Form existieren kann. Ein Vergleich der PCR-Produkte der episomalen Formen (2/3) von LpcGI-Asn mit der genomischen Insel Trb-1, lässt darauf schließen, dass die Exzision von LpcGI-Asn ähnlich häufig erfolgt wie bei Trb-1. LpcGI-Asn codiert für eine ortsspezifische Integrase (*lpc0085*), die ähnlich zu den P4-Integrasen (cd00801) von Bakteriophagen ist (Pierson und Kahn, 1987). P4-ähnliche Integrasen werden in Assoziation mit mobilen genomischen, wie z. B. temperenten Bakteriophagen, integrativen Plasmiden, Pathogenitätsinseln, symbiotischen Inseln, usw. gefunden (Buchrieser et al., 1998; Clark et al., 1991; Ravatn et al., 1998). Die auf LpcGI-Asn codierte Integrase *lpc0085* gehört zu den Proteinen der DNA_BRE_C Superfamilie (cl00213). Diese Proteinfamilie umfasst neben Typ IB Topoisomerasen, auch Tyrosin Rekombinasen. Ähnlich wie die Integrasen Int-1 und Lpc1833, handelt es sich bei Lpc0085 auch um eine Tyrosin Rekombinase. Vermutlich könnte die Integrase Lpc0085 an der Exzision und Integration der genomischen Insel LpcGI-Asn beteiligt sein. Um die Prozesse der Exzision und Integration zu katalysieren benötigen Phagen-Integrasen die „att“ Rekombinationsstellen (Groth und Calos, 2004). Für die chromosomale Form von LpcGI-Asn wurde in der Nukleotidsequenz eine *attL* und eine *attR* Rekombinationssequenz identifiziert. Die Sequenzierung der episomalen Form zeigte, dass *attL* und *attR* während der Exzision von LpcGI-Asn zu *attP* rekombinieren, dabei verblieb im Genom die *attB*-Sequenz. Zusätzlich zu den Rekombinationsstellen ist auf LpcGI-Asn, „stromaufwärts“ und „stromabwärts“ von *attP*, jeweils eine putative IHF-Konsensussequenz lokalisiert, die als Bindestelle für das IHF (Integration host factor) Protein dienen könnte (Hales et al., 1994). Eine dritte IHF-Konsensussequenz befindet sich in der chromosomalen DNA, „stromabwärts“ von *attB*.

Im Vergleich zu den bisher analysierten genomischen Inseln von *Lp* Corby, ist auf LpcGI-Asn weder ein Typ IV Sekretionssystem (T4SS), noch sind T4SS Komponenten codiert. Das Gen *lpc0088* codiert für ein LvrA homologes Protein. LvrA ähnliche Proteine sind Bestandteil der *Legionella vir* Region (*lvr*), die im Genus *Legionella* häufig in Assoziation mit genomischen

Inseln gefunden wird (Cazalet et al., 2004; Glöckner et al., 2008; Gomez-Valero et al., 2011; Schroeder et al., 2010). LvrA verfügt über keine charakteristischen Motive oder Proteindomänen, ebenso ist über die Funktion des Proteins bisher nichts bekannt. Insgesamt lässt sich auch bezüglich der Funktion der gesamten genomischen Insel LpcGI-Asn keine Aussage treffen, da hier experimentelle Grundlagen fehlen. Ein „blastp“ der Aminosäuresequenzen der von LpcGI-Asn codierten Proteine, lieferte nur noch für die Gene *lpc0086* und *lpc0087* putative Funktionen. Die Gene *lpc0089* bis *lpc0091* codieren hingegen für Genprodukte mit unbekannter Funktion. Das Protein Lpc0086 ist ähnlich zu den Gp49 Proteinen (pfam05973) von Bakteriophagen, einer Proteinfamilie mit bisher nicht charakterisierter Funktion. Zudem ist Lpc0086 zu 78 % zur Toxin-Komponente von *Vibrio scophthalmi* homolog. Das zweite Genprodukt Lpc0087 besitzt mit der Antitoxin-Komponente von *V. scophthalmi* eine Übereinstimmung von 64 % und gehört der Familie der HTH_XRE ähnlichen Proteine (cd00093) an. Bei den Mitgliedern dieser Proteinfamilie handelt es sich um Transkriptionsregulatoren. Inwieweit *lpc0086* und *lpc0087* für ein funktionelles Toxin-Antitoxin (TA) System codieren, wurde noch nicht untersucht. Plasmid codierte TA-Systeme dienen als Stabilitätsfaktoren, die verhindern, dass die mobilen genomischen Elemente bei fehlendem Selektionsdruck aus dem bakteriellen Erbgut verschwinden. Typ I TA-Systeme bestehen aus zwei nebeneinander liegenden Genen und codieren jeweils für das Toxin und Antitoxin (Guglielmini und Van Melder, 2011; Hayes und Sauer, 2003). Das „Antitoxin“ neutralisiert das „Toxin“ Protein durch Bindung und verhindert so den Zelltod. Die Funktionalität, des auf LpcGI-Asn codierten TA-Systems, könnte durch die Generierung einer *lpc0087* (Antitoxin) Deletionsmutante untersucht werden. Bei einem aktiven TA-System sollte durch die Deletion der Antitoxin Komponente, das Wachstum von *Lp* Corby durch das Toxin inhibiert werden. Eine *in silico* Analyse der LpcGI-Asn Gene hinsichtlich ihres Vorkommens im Genus *Legionella* zeigte, dass zu *lpc0086* und *lpc0087* homologe Genprodukte auch auf genomischen Elementen von *Lp* Paris (*lpp0073*, *lpp0074*) und *Lp* Alcoy (*lpa_00109*, *lpa_00110*) lokalisiert sind (Cazalet et al., 2008; D'Auria et al., 2010). Bei *Lp* Alcoy sind die beiden Gene auf der genomischen Insel R1 codiert. Ähnlich zu LpcGI-Asn, liegt R1 in der chromosomalen Form auch innerhalb des tRNA^{Asn} Gens integriert vor (D'Auria et al., 2010). Ausgehend von der *attL* und *attR* Rekombinationsstelle, umfasst R1 die Gene *lpa_00108* bis *lpa_00113* und besitzt exakt die gleiche Größe wie LpcGI-Asn (Tab. 19). Dies ist jedoch nicht mit den Angaben von D'Auria und Kollegen (2010) konform. Laut dieser Arbeit umfasst R1 die Gene *lpa_00094* bis *lpa_00113*, ebenso werden für LpcGI-Asn die Gene *lpc0075* bis *lpc0091* angegeben. Anhand

welcher Kriterien die Größe der genomischen Inseln von D'Auria und Kollegen (2010) bestimmt wurde ist nicht bekannt, da weder „stromaufwärts“ von *lpc0075*, noch von *lpa_0094* eine *attR* Rekombinationsstelle identifiziert wurde. Ein Vergleich von R1 und LpcGI-Asn zeigte, dass mit Ausnahme von *lpc0089*, die Aminosäuresequenzen der von LpcGI-Asn codierenden Proteine, zu 100 % mit denjenigen von R1 identisch sind. Das genomische Element von *Lp* Paris liegt ebenfalls innerhalb eines tRNA^{Asn} Gens integriert vor (Cazalet et al., 2008). Im Gegensatz zu R1 von *Lp* Alcoy, zeigt der Vergleich der Aminosäuresequenzen, dass lediglich für die Genen *lpc0085* bis *lpc0088* homologe Proteine auf dem genomischen Element von *Lp* Paris (*lpp0072-lpp0075*) lokalisiert sind. Für die genomische Insel LpcGI-Asn wurde bisher auch noch nicht untersucht inwiefern sie konjugierbar ist und in andere *Legionella* Stämme transferiert werden kann. Das Vorkommen von ähnlichen genomischen Inseln bei *Lp* Paris und *Lp* Alcoy deutet darauf hin, dass LpcGI-Asn von *Lp* Corby vermutlich über horizontalen Gentransfer erworben wurde. Ungeachtet dessen, dass die genomische Insel LpcGI-Asn für kein T4SS codiert, wäre es möglich, dass die genomische Insel mit Hilfe des Trb/Tra Konjugationssystems von Trb-1, in andere *Legionella* Stämme transferiert werden könnte (Glöckner et al., 2008).

Tab. 19: Die Verbreitung der genomischen Insel LpcGI-Asn im Genus *Legionella*.

Stamm	ähnlich zu LpcGI-Asn	tRNA	Genregion	Größe [bp]
<i>L. pneumophila</i> Corby	+	Asn	<i>lpc_0085-0091</i>	6.066
<i>L. pneumophila</i> Paris	+	Asn	<i>lpp_0072-0084</i>	12.208
<i>L. pneumophila</i> Alcoy	+	Asn	<i>lpa_00108-00113</i>	6.066

4.3.3 Die genomische Insel LpcGI-Phe

Analog zur genomischen Insel LpcGI-Asn, wurde LpcGI-Phe im Genom von *L. pneumophila* Corby mittels einer *in silico* Analyse identifiziert. Bei LpcGI-Phe handelt es sich ebenfalls um eine genomische Insel. LpcGI-Phe liegt im *Lp* Corby Chromosom innerhalb des tRNA^{Phe} Gens integriert vor und wird von den Rekombinationsstellen *attL* und *attR* flankiert. In unmittelbarer Nähe von *attR* ist eine ortsspezifische Integrase (*lpc1395*) codiert, die eine Ähnlichkeit zu den P4-Integrasen (cd00801) von Bakteriophagen aufweist, die in Assoziation mit mobilen genomischen Elementen gefunden werden. Bei der ortsspezifischen Integrase *lpc0085* von LpcGI-Asn, handelt es sich ebenfalls um eine P4-ähnliche Phagen-Integrase. Eine zweite putative Integrase wird durch *lpc1391* codiert, die zur Familie der DNA-bindenden Prophagen-Integrasen (pfam12835) gehört und bei Proteobacteria gefunden werden. Bei beiden LpcGI-Phe codierten putativen Integrasen handelt es sich um Tyrosin Rekombinasen der DNA_BRE_C Superfamilie (cl00213). Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen zeigte, dass die Integrasen Lpc1395 und Lpc1391 zueinander nicht homolog sind. Im Gegensatz zu den bisher diskutierten genomischen Inseln von *Lp* Corby, existiert LpcGI-Phe vermutlich nur in einer chromosomalen Form, da eine zirkuläre episomale Form experimentell nicht detektiert werden konnte. Es ist gut möglich, dass die Exzision der genomischen Insel LpcGI-Phe nur in sehr geringem Maße erfolgt und daher die Analyse mittels PCR kein Ergebnis lieferte. Aufschluss über das Vorkommen von LpcGI-Phe als zirkuläre Form, könnte möglicherweise eine Analyse mittels Real-time PCR geben. Andererseits ist es auch möglich, dass bei der genomischen Insel keine Exzision erfolgen kann, da DNA-Bindestellen für Faktoren fehlen, die neben der Integrase auch an der Katalyse der Exzision beteiligt sind. Mittels *in silico* Analyse wurden die flankierenden *att*-Rekombinationsstellen und die Nukleotidsequenzen „stromabwärts“ und „stromaufwärts“ dieser Sequenzen untersucht. „Stromabwärts“ von *attL* wurde eine putative DNA-Bindestelle für das IHF-Protein identifiziert. Hingegen wurde „stromaufwärts“ von *attR* keine IHF-Konsensussequenz gefunden. Die fehlende IHF-Bindestelle könnte dazu führen, dass das IHF-Protein an dieser Stelle nicht an die DNA binden kann.

Ähnlich wie LpcGI-Asn codiert auch die genomische Insel LpcGI-Phe für kein Typ IV Sekretionssystem oder einzelne Komponenten dieses Systems. Inwiefern LpcGI-Phe in andere *Legionella* Stämme konjugiert werden kann, ist nicht bekannt. Es wäre möglich, dass die genomische Insel über das Trb/Tra Konjugationssystem von Trb-1 transferiert werden könnte (Glöckner et al., 2008). Andererseits existiert LpcGI-Phe vermutlich nur in einer

chromosomalen Form und die experimentellen Daten für Trb-1 und LpcGI-2 zeigten, dass die Konjugation der genomischen Inseln vorwiegend in der episomalen Form erfolgt. Es ist jedoch zu vermuten, dass LpcGI-Phe von *Lp* Corby über horizontalen Gentransfer aufgenommen wurde. Eine zu LpcGI-Phe ähnliche genomische Insel ist auch im Genom von *Lp* Alcoy lokalisiert. Die genomische Insel von *Lp* Alcoy ist um 2.430 bp kleiner als LpcGI-Phe, sie liegt aber ebenfalls innerhalb des tRNA^{Phe} Gens integriert vor. Der Proteinblast der Aminosäuresequenzen der LpcGI-Phe codierten Proteine zeigte, mit Ausnahme von *lpc1384*, *lpc1388*, *lpc1389* und *lpc1394*, dass die anderen Proteine im Durchschnitt zu ca. 98 % zu den Genprodukten der *Lp* Alcoy Insel ähnlich sind. Die *L. pneumophila* Stämme Alcoy und Corby sind phylogenetisch nah verwandt und haben ca. 2.560 Gene gemeinsam (D'Auria et al., 2010). Die beiden genomischen Inseln von *Lp* Corby und Alcoy besitzen den gleichen Integrationsort und haben acht Gene gemeinsam, die zudem eine hohe Homologie aufweisen. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass beide genomischen Inseln einen gemeinsamen Ursprung haben könnten. Ähnlich wie bereits für Trb-1 und DT2 von D'Auria und Kollegen (2010) vermutet, könnte die genomische Insel LpcGI-Phe von *Lp* Corby und *Lp* Alcoy vor der Divergenz der beiden Stämme über horizontalen Gentransfer erworben worden sein. Bis auf *Lp* Alcoy wurde in den anderen bisher sequenzierten *Legionella* Stämmen keine genomische Insel identifiziert, die zu LpcGI-Phe eine Ähnlichkeit aufweist. Über eine mögliche Funktion der genomischen Insel ist nichts bekannt. LpcGI-Phe ist im Genus *Legionella* nicht weit verbreitet. Zudem codiert keines der 12 Gene auf der genomischen Insel, für bisher bekannte putative Virulenzfaktoren oder Resistenzgene. Daher ist zu vermuten, dass es sich bei LpcGI-Phe um eine genomische Insel handelt, die keine oder nur eine geringe Bedeutung für die Fitness von *L. pneumophila* Corby haben könnte.

Tab. 20: Die Verbreitung der genomischen Insel LpcGI-Phe im Genus *Legionella*.

Stamm	ähnlich zu LpcGI-Phe	tRNA	Genregion	Größe [bp]
<i>L. pneumophila</i> Corby	+	Phe	<i>lpc_1384-1395</i>	11.554
<i>L. pneumophila</i> Alcoy	+	Phe	<i>lpa_02788-02800</i>	9.124

4.4 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten neue Erkenntnisse zum Aufbau, zur Regulation zur Funktion und zur Verbreitung der genomischen Inseln von *L. pneumophila* Corby gewonnen werden.

Die genomische Insel Trb-1 kann sowohl in einer, innerhalb des tRNA^{Pro} Gens, integrierten chromosomalen, als auch in einer episomalen zirkulären Form vorliegen. Die Exzision von Trb-1 ist von der ortsspezifischen Integrase Int-1 abhängig und wird unter Beteiligung der *Legionella vir* Region (*lvr*) reguliert, die für die Proteine LvrRABC codiert. Für LvrR konnte bereits gezeigt werden, dass der Phagen-Repressor die Exzision von Trb-1 reguliert. Es bleibt zu untersuchen, ob LvrR als positiver oder negativer Regulator fungiert und in wie fern diese Regulation indirekt über das CsrA homologe Protein LvrC erfolgt. Hierfür muss noch eine $\Delta lvrC$ Mutante generiert und analysiert werden. Über die Funktion von LvrA und LvrB ist bisher nichts bekannt, ebenso ist der Anteil der beiden Proteine an der Regulation der Exzision noch unklar. Für eine nähere Charakterisierung müssen eine $\Delta lvrA$ und $\Delta lvrB$ Deletionsmutante generiert und diese anschließend hinsichtlich der Exzision und Bildung der episomalen Form von Trb-1 untersucht werden. Die Charakterisierung der Mutante $\Delta int-1$ zeigte, dass Trb-1 hauptsächlich in der episomalen Form konjugiert wird. Es wäre daher interessant zu untersuchen, ob eine häufigere Exzision von Trb-1, wie dies bei den Mutanten $\Delta lvrR$ oder $\Delta lvrRABC$ der Fall ist, mit einer Zunahme der Konjugationsrate einhergeht.

Die Analyse von LpcGI-1 und LpcGI-2 zeigte, dass die genomischen Inseln in zwei bzw. drei verschiedenen episomalen und chromosomalen Formen existieren können. Für die ortsspezifische Integrase *lpc1833*, konnte zudem gezeigt werden, dass die Integrase an der Exzision und Bildung der episomalen Form A von LpcGI-2 beteiligt ist. LpcGI-1 codiert ähnlich wie LpcGI-2 für drei putative Integrasen. Durch die Generierung von Deletionsmutanten könnte überprüft werden, welche der codierten Integrasen an der Exzision der genomischen Insel LpcGI-1 beteiligt sind.

Auf den genomischen Inseln LpcGI-1 und LpcGI-2 von *L. pneumophila* Corby ist ein neues Typ IV Sekretionssystem (T4SS) codiert, das sogenannte GI-T4SS. In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass das auf LpcGI-2 lokalisierte GI-T4SS funktionell ist und die Konjugation der genomischen Insel in einen anderen *L. pneumophila* Stamm vermitteln kann. Des Weiteren könnte untersucht werden, in wieweit LpcGI-2 auch in andere *Legionella* bzw. „nicht“-*pneumophila* Stämme konjugiert werden kann. Ein weiterer Aspekt wäre die Untersuchung der Konjugation von LpcGI-1 in andere *Legionella* Stämme. Da LpcGI-1

ähnliche Inseln im Genus *Legionella* weit verbreitet sind, müsste als Rezipient ein Stamm gesucht werden, der für ein LpcGI-1 ähnliches Element negativ ist. Als geeigneter Rezipient könnte sich hier *L. oakridgensis* ATCC 33761 erweisen. Bei *L. oakridgensis* ATCC 33761 handelt es sich um einen *Legionella* Stamm, der kürzlich von unserer Arbeitsgruppe sequenziert wurde und weder für eine LpcGI-1, noch für eine LpcGI-2 ähnliche genomische Insel codiert. Anhand der Transkonjuganten, die aus dieser Konjugation hervorgingen, könnte anschließend die Bedeutung von LpcGI-1 für die *in vivo* Replikation und die Virulenz von *Legionella* untersucht werden.

Die genomische Insel LpcGI-1 codiert für einen Cobalt/Zink/Cadmium Efflux System (*helABC*), für chemiosmotische Efflux Systeme (*cebABC*, *cecABC*) und mehrere ATP-abhängige Efflux Pumpen (*cadA*, *ctpA*, *copA1*, *copA2*). Durch die Deletion des *hel*-Genlokus könnte die Sensitivität der *Lp* Corby Mutanten gegenüber Schwermetallionen, während der *in vitro* und *in vivo* Replikation untersucht werden. Ähnlich könnte auch mit der Analyse der chemiosmotischen Efflux Systeme verfahren werden.

Literaturverzeichnis

- Abu-Zant, A.; Jones, S.; Asare, R.; Suttles, J.; Price, C.; Graham, J. und Kwaik, Y. A. (2007): Anti-apoptotic signalling by the Dot/Icm secretion system of *L. pneumophila*, *Cell Microbiol* 9 [1], Seite 246-64.
- Abu Kwaik, Y. (1996): The phagosome containing *Legionella pneumophila* within the protozoan *Hartmannella vermiformis* is surrounded by the rough endoplasmic reticulum, *Appl Environ Microbiol* 62 [6], Seite 2022-8.
- Adeleke, A. A.; Fields, B. S.; Benson, R. F.; Daneshvar, M. I.; Pruckler, J. M.; Ratcliff, R. M.; Harrison, T. G.; Weyant, R. S.; Birtles, R. J.; Raoult, D. und Halablab, M. A. (2001): *Legionella drozanskii* sp. nov., *Legionella rowbothamii* sp. nov. and *Legionella fallonii* sp. nov.: three unusual new *Legionella* species, *Int J Syst Evol Microbiol* 51 [Pt 3], Seite 1151-60.
- Adeleke, A.; Pruckler, J.; Benson, R.; Rowbotham, T.; Halablab, M. und Fields, B. (1996): *Legionella*-like amoebal pathogens--phylogenetic status and possible role in respiratory disease, *Emerg Infect Dis* 2 [3], Seite 225-30.
- Aizawa, S. I. (2001): Bacterial flagella and type III secretion systems, *FEMS Microbiol Lett* 202 [2], Seite 157-64.
- Albert-Weissenberger, C.; Sahr, T.; Sismeiro, O.; Hacker, J.; Heuner, K. und Buchrieser, C. (2010): Control of flagellar gene regulation in *Legionella pneumophila* and its relation to growth phase, *J Bacteriol* 192 [2], Seite 446-55.
- Albert, C.; Jacobi, S.; De Buck, E.; Lammertyn, E. und Heuner, K. (2006): Identification of target proteins of the lss secretion system of *Legionella pneumophila* Corby, Cianciotto, N. P., Abu Kwaik, Y., Edelstein, P.H., Fields, B. S., Geary, D.F., Harrison, T.G., Joseph, C.A., Ratcliff, R. M., Stout J.E., Swanson, M.S. , *Legionella*, state of the art 30 years after its recognition Seite 221-223, ASM Press, Washington DC.
- Alli, O. A.; Gao, L. Y.; Pedersen, L. L.; Zink, S.; Radulic, M.; Doric, M. und Abu Kwaik, Y. (2000): Temporal pore formation-mediated egress from macrophages and alveolar epithelial cells by *Legionella pneumophila*, *Infect Immun* 68 [11], Seite 6431-40.
- Amaro, F.; Gilbert, J. A.; Owens, S.; Trimble, W. und Shuman, H. A. (2012): Whole-genome sequence of the human pathogen *Legionella pneumophila* serogroup 12 strain 570-CO-H, *J Bacteriol* 194 [6], Seite 1613-4.
- Andrews, H. L.; Vogel, J. P. und Isberg, R. R. (1998): Identification of linked *Legionella pneumophila* genes essential for intracellular growth and evasion of the endocytic pathway, *Infect Immun* 66 [3], Seite 950-8.
- Arroyo, J.; Hurley, M. C.; Wolf, M.; McClain, M. S.; Eisenstein, B. I. und Engleberg, N. C. (1994): Shuttle mutagenesis of *Legionella pneumophila*: identification of a gene associated with host cell cytopathicity, *Infect Immun* 62 [9], Seite 4075-80.
- Bachman, M. A. und Swanson, M. S. (2001): RpoS co-operates with other factors to induce *Legionella pneumophila* virulence in the stationary phase, *Mol Microbiol* 40 [5], Seite 1201-14.
- Bandyopadhyay, P.; Liu, S.; Gabbai, C. B.; Venitelli, Z. und Steinman, H. M. (2007): Environmental mimics and the Lvh type IVA secretion system contribute to virulence-related phenotypes of *Legionella pneumophila*, *Infect Immun* 75 [2], Seite 723-35.
- Barker, J.; Scaife, H. und Brown, M. R. (1995): Intraphagocytic growth induces an antibiotic-resistant phenotype of *Legionella pneumophila*, *Antimicrob Agents Chemother* 39 [12], Seite 2684-8.
- Beaber, J. W.; Hochhut, B. und Waldor, M. K. (2002): Genomic and functional analyses of SXT, an integrating antibiotic resistance gene transfer element derived from *Vibrio cholerae*, *J Bacteriol* 184 [15], Seite 4259-69.
- Bell, C. E. (2005): Structure and mechanism of *Escherichia coli* RecA ATPase, *Mol Microbiol* 58 [2], Seite 358-66.
- Bellanger, X.; Roberts, A. P.; Morel, C.; Choulet, F.; Pavlovic, G.; Mullany, P.; Decaris, B. und Guedon, G. (2009): Conjugative transfer of the integrative conjugative elements ICES_{t1} and ICES_{t3} from *Streptococcus thermophilus*, *J Bacteriol* 191 [8], Seite 2764-75.
- Benson, R. F. und Fields, B. S. (1998): Classification of the genus *Legionella*, *Semin Respir Infect* 13 [2], Seite 90-9.

- Berk, S. G.; Ting, R. S.; Turner, G. W. und Ashburn, R. J. (1998): Production of respirable vesicles containing live *Legionella pneumophila* cells by two *Acanthamoeba* spp, *Appl Environ Microbiol* 64 [1], Seite 279-86.
- Berks, B. C.; Palmer, T. und Sargent, F. (2003): The Tat protein translocation pathway and its role in microbial physiology, *Adv Microb Physiol* 47, Seite 187-254.
- Binet, R.; Letoffe, S.; Ghigo, J. M.; Delepelaire, P. und Wandersman, C. (1997): Protein secretion by Gram-negative bacterial ABC exporters--a review, *Gene* 192 [1], Seite 7-11.
- Blackmon, J. A.; Chandler, F. W.; Cherry, W. B.; England, A. C., 3rd; Feeley, J. C.; Hicklin, M. D.; McKinney, R. M. und Wilkinson, H. W. (1981): Legionellosis, *Am J Pathol* 103 [3], Seite 429-65.
- Boshuizen, H. C.; Den Boer, J. W.; de Melker, H.; Schellekens, J. F.; Peeters, M. F.; van Vliet, J. A. und Conyn-van Spaendonck, M. A. (2003): Reference values for the SERION classic ELISA for detecting *Legionella pneumophila* antibodies, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 22 [11], Seite 706-8.
- Boshuizen, H. C.; Neppelenbroek, S. E.; van Vliet, H.; Schellekens, J. F.; den Boer, J. W.; Peeters, M. F. und Conyn-van Spaendonck, M. A. (2001): Subclinical *Legionella* infection in workers near the source of a large outbreak of Legionnaires disease, *J Infect Dis* 184 [4], Seite 515-8.
- Boyd, E. F.; Almagro-Moreno, S. und Parent, M. A. (2009): Genomic islands are dynamic, ancient integrative elements in bacterial evolution, *Trends Microbiol* 17 [2], Seite 47-53.
- Brown, W. R.; Lee, N. C.; Xu, Z. und Smith, M. C. (2011): Serine recombinases as tools for genome engineering, *Methods* 53 [4], Seite 372-9.
- Brüggemann, H.; Hagman, A.; Jules, M.; Sismeiro, O.; Dillies, M. A.; Gouyette, C.; Kunst, F.; Steinert, M.; Heuner, K.; Coppee, J. Y. und Buchrieser, C. (2006): Virulence strategies for infecting phagocytes deduced from the *in vivo* transcriptional program of *Legionella pneumophila*, *Cell Microbiol* 8 [8], Seite 1228-40.
- Buchrieser, C.; Brosch, R.; Bach, S.; Guiry, A. und Carniel, E. (1998): The high-pathogenicity island of *Yersinia pseudotuberculosis* can be inserted into any of the three chromosomal *asn* tRNA genes, *Mol Microbiol* 30 [5], Seite 965-78.
- Buchrieser, C.; Prentice, M. und Carniel, E. (1998): The 102-kilobase unstable region of *Yersinia pestis* comprises a high-pathogenicity island linked to a pigmentation segment which undergoes internal rearrangement, *J Bacteriol* 180 [9], Seite 2321-9.
- Burrus, V.; Pavlovic, G.; Decaris, B. und Guedon, G. (2002): Conjugative transposons: the tip of the iceberg, *Mol Microbiol* 46 [3], Seite 601-10.
- Byrne, B. und Swanson, M. S. (1998): Expression of *Legionella pneumophila* virulence traits in response to growth conditions, *Infect Immun* 66 [7], Seite 3029-34.
- Campbell, A. M. (1992): Chromosomal insertion sites for phages and plasmids, *J Bacteriol* 174 [23], Seite 7495-9.
- Carniel, E.; Guilvout, I. und Prentice, M. (1996): Characterization of a large chromosomal "high-pathogenicity island" in biotype 1B *Yersinia enterocolitica*, *J Bacteriol* 178 [23], Seite 6743-51.
- Cazalet, C.; Gomez-Valero, L.; Rusniok, C.; Lomma, M.; Dervins-Ravault, D.; Newton, H. J.; Sansom, F. M.; Jarraud, S.; Zidane, N.; Ma, L.; Bouchier, C.; Etienne, J.; Hartland, E. L. und Buchrieser, C. (2010): Analysis of the *Legionella longbeachae* genome and transcriptome uncovers unique strategies to cause Legionnaires' disease, *PLoS Genet* 6 [2], Seite e1000851.
- Cazalet, C.; Jarraud, S.; Ghavi-Helm, Y.; Kunst, F.; Glaser, P.; Etienne, J. und Buchrieser, C. (2008): Multigenome analysis identifies a worldwide distributed epidemic *Legionella pneumophila* clone that emerged within a highly diverse species, *Genome Res* 18 [3], Seite 431-41.
- Cazalet, C.; Rusniok, C.; Brüggemann, H.; Zidane, N.; Magnier, A.; Ma, L.; Tichit, M.; Jarraud, S.; Bouchier, C.; Vandenesch, F.; Kunst, F.; Etienne, J.; Glaser, P. und Buchrieser, C. (2004): Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity, *Nat Genet* 36 [11], Seite 1165-73.
- Chandler, F. W.; Thomason, B. M. und Hebert, G. A. (1980): Flagella on Legionnaires' disease bacteria in the human lung, *Ann Intern Med* 93 [5], Seite 715-6.
- Chen, I.; Christie, P. J. und Dubnau, D. (2005): The ins and outs of DNA transfer in bacteria, *Science* 310 [5753], Seite 1456-60.

- Chien, M.; Morozova, I.; Shi, S.; Sheng, H.; Chen, J.; Gomez, S. M.; Asamani, G.; Hill, K.; Nuara, J.; Feder, M.; Rineer, J.; Greenberg, J. J.; Steshenko, V.; Park, S. H.; Zhao, B.; Teplitskaya, E.; Edwards, J. R.; Pampou, S.; Georgiou, A.; Chou, I. C.; Iannuccilli, W.; Ulz, M. E.; Kim, D. H.; Geringer-Sameth, A.; Goldsberry, C.; Morozov, P.; Fischer, S. G.; Segal, G.; Qu, X.; Rzhetsky, A.; Zhang, P.; Cayanis, E.; De Jong, P. J.; Ju, J.; Kalachikov, S.; Shuman, H. A. und Russo, J. J. (2004): The genomic sequence of the accidental pathogen *Legionella pneumophila*, Science 305 [5692], Seite 1966-8.
- Chilley, P. M. und Wilkins, B. M. (1995): Distribution of the *ardA* family of antirestriction genes on conjugative plasmids, Microbiology 141 (Pt 9), Seite 2157-64.
- China, B. und Goffaux, F. (1999): Secretion of virulence factors by *Escherichia coli*, Vet Res 30 [2-3], Seite 181-202.
- Cho, E. H.; Gumpert, R. I. und Gardner, J. F. (2002): Interactions between integrase and excisionase in the phage lambda excisive nucleoprotein complex, J Bacteriol 184 [18], Seite 5200-3.
- Chopin, M. C.; Chopin, A. und Bidnenko, E. (2005): Phage abortive infection in lactococci: variations on a theme, Curr Opin Microbiol 8 [4], Seite 473-9.
- Christie, P. J. (1997): *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in eubacteria, J Bacteriol 179 [10], Seite 3085-94.
- Christie, P. J.; Atmakuri, K.; Krishnamoorthy, V.; Jakubowski, S. und Cascales, E. (2005): Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems, Annu Rev Microbiol 59, Seite 451-85.
- Christie, P. J. und Vogel, J. P. (2000): Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells, Trends Microbiol 8 [8], Seite 354-60.
- Cianciotto, N. P. (2009): Many substrates and functions of type II secretion: lessons learned from *Legionella pneumophila*, Future Microbiol 4 [7], Seite 797-805.
- Cianciotto, N. P.; Eisenstein, B. I.; Mody, C. H.; Toews, G. B. und Engleberg, N. C. (1989): A *Legionella pneumophila* gene encoding a species-specific surface protein potentiates initiation of intracellular infection, Infect Immun 57 [4], Seite 1255-62.
- Cirillo, J. D.; Cirillo, S. L.; Yan, L.; Bermudez, L. E.; Falkow, S. und Tompkins, L. S. (1999): Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*, Infect Immun 67 [9], Seite 4427-34.
- Clark, C. A.; Beltrame, J. und Manning, P. A. (1991): The *oac* gene encoding a lipopolysaccharide O-antigen acetylase maps adjacent to the integrase-encoding gene on the genome of *Shigella flexneri* bacteriophage Sf6, Gene 107 [1], Seite 43-52.
- Conover, G. M.; Derre, I.; Vogel, J. P. und Isberg, R. R. (2003): The *Legionella pneumophila* LidA protein: a translocated substrate of the Dot/Icm system associated with maintenance of bacterial integrity, Mol Microbiol 48 [2], Seite 305-21.
- Craig, N. L. und Nash, H. A. (1984): *E. coli* integration host factor binds to specific sites in DNA, Cell 39 [3 Pt 2], Seite 707-16.
- D'Auria, G.; Jimenez-Hernandez, N.; Peris-Bondia, F.; Moya, A. und Latorre, A. (2010): *Legionella pneumophila* pangenome reveals strain-specific virulence factors, BMC Genomics 11, Seite 181.
- Dale, E. C. und Ow, D. W. (1991): Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome, Proc Natl Acad Sci U S A 88 [23], Seite 10558-62.
- Dalebroux, Z. D.; Edwards, R. L. und Swanson, M. S. (2009): SpoT governs *Legionella pneumophila* differentiation in host macrophages, Mol Microbiol 71 [3], Seite 640-58.
- Dame, R. T.; van Mameren, J.; Luijsterburg, M. S.; Mysiak, M. E.; Janicijevic, A.; Pazdzior, G.; van der Vliet, P. C.; Wyman, C. und Wuite, G. J. (2005): Analysis of scanning force microscopy images of protein-induced DNA bending using simulations, Nucleic Acids Res 33 [7], Seite e68.
- Davison, J. (1999): Genetic exchange between bacteria in the environment, Plasmid 42 [2], Seite 73-91.
- De Buck, E.; Anne, J. und Lammertyn, E. (2007): The role of protein secretion systems in the virulence of the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*, Microbiology 153 [Pt 12], Seite 3948-53.
- De Buck, E.; Lebeau, I.; Maes, L.; Geukens, N.; Meyen, E.; Van Mellaert, L.; Anne, J. und Lammertyn, E. (2004): A putative twin-arginine translocation pathway in *Legionella pneumophila*, Biochem Biophys Res Commun 317 [2], Seite 654-61.
- De Buck, E.; Maes, L.; Meyen, E.; Van Mellaert, L.; Geukens, N.; Anne, J. und Lammertyn, E. (2005): *Legionella pneumophila* Philadelphia-1 *tatB* and *tatC* affect intracellular replication and biofilm formation, Biochem Biophys Res Commun 331 [4], Seite 1413-20.

- de Keyzer, J.; van der Does, C. und Driessen, A. J. (2003): The bacterial translocase: a dynamic protein channel complex, *Cell Mol Life Sci* 60 [10], Seite 2034-52.
- Debroy, S.; Dao, J.; Soderberg, M.; Rossier, O. und Cianciotto, N. P. (2006): *Legionella pneumophila* type II secretome reveals unique exoproteins and a chitinase that promotes bacterial persistence in the lung, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 [50], Seite 19146-51.
- Den Boer, J.W. und Yzerman, E.P. (2004): Diagnosis of *Legionella* infection in Legionnaires' disease., *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 23 [12], Seite 871-8.
- Desvaux, M.; Parham, N. J. und Henderson, I. R. (2004): The autotransporter secretion system, *Res Microbiol* 155 [2], Seite 53-60.
- Diederer, B. M. (2008): *Legionella* spp. and Legionnaires' disease, *J Infect* 56 [1], Seite 1-12.
- Dietrich, C.; Heuner, K.; Brand, B. C.; Hacker, J. und Steinert, M. (2001): Flagellum of *Legionella pneumophila* positively affects the early phase of infection of eukaryotic host cells, *Infect Immun* 69 [4], Seite 2116-22.
- Ding, Z.; Atmakuri, K. und Christie, P. J. (2003): The outs and ins of bacterial type IV secretion substrates, *Trends Microbiol* 11 [11], Seite 527-35.
- Dobrindt, U.; Hochhut, B.; Hentschel, U. und Hacker, J. (2004): Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms, *Nat Rev Microbiol* 2 [5], Seite 414-24.
- Doleans-Jordheim, A.; Akermi, M.; Ginevra, C.; Cazalet, C.; Kay, E.; Schneider, D.; Buchrieser, C.; Atlan, D.; Vandenesch, F.; Etienne, J. und Jarraud, S. (2006): Growth-phase-dependent mobility of the *lvh*-encoding region in *Legionella pneumophila* strain Paris, *Microbiology* 152 [Pt 12], Seite 3561-8.
- Dreyfus, L. A. (1989): Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of the *recA* gene of *Legionella pneumophila*, *J Gen Microbiol* 135 [11], Seite 3097-107.
- Dubey, A. K.; Baker, C. S.; Romeo, T. und Babitzke, P. (2005): RNA sequence and secondary structure participate in high-affinity CsrA-RNA interaction, *RNA* 11 [10], Seite 1579-87.
- Edelstein, P. H. (1987): Laboratory diagnosis of infections caused by legionellae, *Eur J Clin Microbiol* 6 [2], Seite 216.
- Edelstein, P. H. (2008): Legionnaires' disease: History and clinical findings, Heuner, K. and Swanson, M., *Legionella Molecular Microbiology*, Caister Academic Press, Norfolk, UK.
- Edelstein, P. H.; Weiss, W. J. und Edelstein, M. A. (2003): Activities of tigecycline (GAR-936) against *Legionella pneumophila* in vitro and in guinea pigs with *L. pneumophila* pneumonia, *Antimicrob Agents Chemother* 47 [2], Seite 533-40.
- Engleberg, N. C.; Carter, C.; Weber, D. R.; Cianciotto, N. P. und Eisenstein, B. I. (1989): DNA sequence of *mip*, a *Legionella pneumophila* gene associated with macrophage infectivity, *Infect Immun* 57 [4], Seite 1263-70.
- Enquist, L. W.; Kikuchi, A. und Weisberg, R. A. (1979): The role of lambda integrase in integration and excision, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 43 Pt 2, Seite 1115-20.
- Ensminger, A. W. und Isberg, R. R. (2009): *Legionella pneumophila* Dot/Icm translocated substrates: a sum of parts, *Curr Opin Microbiol* 12 [1], Seite 67-73.
- Esposito, D. und Scocca, J. J. (1997): The integrase family of tyrosine recombinases: evolution of a conserved active site domain, *Nucleic Acids Res* 25 [18], Seite 3605-14.
- Fernandez De Henestrosa, A. R.; Ogi, T.; Aoyagi, S.; Chafin, D.; Hayes, J. J.; Ohmori, H. und Woodgate, R. (2000): Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*, *Mol Microbiol* 35 [6], Seite 1560-72.
- Fettes, P. S.; Forsbach-Birk, V.; Lynch, D. und Marre, R. (2001): Overexpression of a *Legionella pneumophila* homologue of the *E. coli* regulator *csrA* affects cell size, flagellation, and pigmentation, *Int J Med Microbiol* 291 [5], Seite 353-60.
- Fields, B. S. (1996): The molecular ecology of *legionellae*, *Trends Microbiol* 4 [7], Seite 286-90.
- Fields, B. S.; Benson, R. F. und Besser, R. E. (2002): *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation, *Clin Microbiol Rev* 15 [3], Seite 506-26.
- Fischer, G.; Bang, H.; Ludwig, B.; Mann, K. und Hacker, J. (1992): Mip protein of *Legionella pneumophila* exhibits peptidyl-prolyl-cis/trans isomerase (PPlase) activity, *Mol Microbiol* 6 [10], Seite 1375-83.
- Flannery, B.; Gelling, L. B.; Vugia, D. J.; Weintraub, J. M.; Salerno, J. J.; Conroy, M. J.; Stevens, V. A.; Rose, C. E.; Moore, M. R.; Fields, B. S. und Besser, R. E. (2006): Reducing *Legionella* colonization in water systems with monochloramine, *Emerg Infect Dis* 12 [4], Seite 588-96.

- Flannery, E. L.; Antczak, S. M. und Mobley, H. L. (2011): Self-transmissibility of the integrative and conjugative element ICEPm1 between clinical isolates requires a functional integrase, relaxase, and type IV secretion system, *J Bacteriol* 193 [16], Seite 4104-12.
- Fliermans, C. B.; Cherry, W. B.; Orrison, L. H.; Smith, S. J.; Tison, D. L. und Pope, D. H. (1981): Ecological distribution of *Legionella pneumophila*, *Appl Environ Microbiol* 41 [1], Seite 9-16.
- Fraser, D. W.; Tsai, T. R.; Orenstein, W.; Parkin, W. E.; Beecham, H. J.; Sharrar, R. G.; Harris, J.; Mallison, G. F.; Martin, S. M.; McDade, J. E.; Shepard, C. C. und Brachman, P. S. (1977): Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia, *N Engl J Med* 297 [22], Seite 1189-97.
- Freundlich, M.; Ramani, N.; Mathew, E.; Sirko, A. und Tsui, P. (1992): The role of integration host factor in gene expression in *Escherichia coli*, *Mol Microbiol* 6 [18], Seite 2557-63.
- Friedman, D. I. (1988): Integration host factor: a protein for all reasons, *Cell* 55 [4], Seite 545-54.
- Frost, L. S.; Ippen-Ihler, K. und Skurray, R. A. (1994): Analysis of the sequence and gene products of the transfer region of the F sex factor, *Microbiol Rev* 58 [2], Seite 162-210.
- Gao, L. Y.; Harb, O. S. und Abu Kwaik, Y. (1997): Utilization of similar mechanisms by *Legionella pneumophila* to parasitize two evolutionarily distant host cells, mammalian macrophages and protozoa, *Infect Immun* 65 [11], Seite 4738-46.
- Gao, L. Y. und Kwaik, Y. A. (2000): The mechanism of killing and exiting the protozoan host *Acanthamoeba polyphaga* by *Legionella pneumophila*, *Environ Microbiol* 2 [1], Seite 79-90.
- Garduno, R. A.; Garduno, E.; Hiltz, M. und Hoffman, P. S. (2002): Intracellular growth of *Legionella pneumophila* gives rise to a differentiated form dissimilar to stationary-phase forms, *Infect Immun* 70 [11], Seite 6273-83.
- Gerlach, R. G. und Hensel, M. (2007): Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens, *Int J Med Microbiol* 297 [6], Seite 401-15.
- Glick, T. H.; Gregg, M. B.; Berman, B.; Mallison, G.; Rhodes, W. W., Jr. und Kassanoff, I. (1978): Pontiac fever. An epidemic of unknown etiology in a health department: I. Clinical and epidemiologic aspects, *Am J Epidemiol* 107 [2], Seite 149-60.
- Glöckner, G.; Albert-Weissenberger, C.; Weinmann, E.; Jacobi, S.; Schunder, E.; Steinert, M.; Hacker, J. und Heuner, K. (2008): Identification and characterization of a new conjugation/type IVA secretion system (trb/tra) of *Legionella pneumophila* Corby localized on two mobile genomic islands, *Int J Med Microbiol* 298 [5-6], Seite 411-28.
- Gomez-Valero, L.; Rusniok, C. und Buchrieser, C. (2009): *Legionella pneumophila*: population genetics, phylogeny and genomics, *Infect Genet Evol* 9 [5], Seite 727-39.
- Gomez-Valero, L.; Rusniok, C.; Jarraud, S.; Vacherie, B.; Rouy, Z.; Barbe, V.; Medigue, C.; Etienne, J. und Buchrieser, C. (2011): Extensive recombination events and horizontal gene transfer shaped the *Legionella pneumophila* genomes, *BMC Genomics* 12, Seite 536.
- Grainge, I. und Jayaram, M. (1999): The integrase family of recombinase: organization and function of the active site, *Mol Microbiol* 33 [3], Seite 449-56.
- Grindley, N. D.; Whiteson, K. L. und Rice, P. A. (2006): Mechanisms of site-specific recombination, *Annu Rev Biochem* 75, Seite 567-605.
- Groth, A. C. und Calos, M. P. (2004): Phage integrases: biology and applications, *J Mol Biol* 335 [3], Seite 667-78.
- Guglielmini, J. und Van Melder, L. (2011): Bacterial toxin-antitoxin systems: Translation inhibitors everywhere, *Mob Genet Elements* 1 [4], Seite 283-290.
- Habyarimana, F.; Al-Khodori, S.; Kalia, A.; Graham, J. E.; Price, C. T.; Garcia, M. T. und Kwaik, Y. A. (2008): Role for the Ankyrin eukaryotic-like genes of *Legionella pneumophila* in parasitism of protozoan hosts and human macrophages, *Environ Microbiol* 10 [6], Seite 1460-74.
- Hacker, J.; Bender, L.; Ott, M.; Wingender, J.; Lund, B.; Marre, R. und Goebel, W. (1990): Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur in vitro and in vivo in various extraintestinal *Escherichia coli* isolates, *Microb Pathog* 8 [3], Seite 213-25.
- Hacker, J.; Blum-Oehler, G.; Muhldorfer, I. und Tschape, H. (1997): Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution, *Mol Microbiol* 23 [6], Seite 1089-97.
- Hacker, J. und Carniel, E. (2001): Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes, *EMBO Rep* 2 [5], Seite 376-81.
- Hacker, J. und Fischer, G. (1993): Immunophilins: structure-function relationship and possible role in microbial pathogenicity, *Mol Microbiol* 10 [3], Seite 445-56.

- Hales, L. M.; Gumport, R. I. und Gardner, J. F. (1994): Determining the DNA sequence elements required for binding integration host factor to two different target sites, *J Bacteriol* 176 [10], Seite 2999-3006.
- Hales, L. M. und Shuman, H. A. (1999): *Legionella pneumophila* contains a type II general secretion pathway required for growth in amoebae as well as for secretion of the Msp protease, *Infect Immun* 67 [7], Seite 3662-6.
- Hales, L. M. und Shuman, H. A. (1999): The *Legionella pneumophila* rpoS gene is required for growth within *Acanthamoeba castellanii*, *J Bacteriol* 181 [16], Seite 4879-89.
- Hammer, B. K. und Swanson, M. S. (1999): Co-ordination of legionella pneumophila virulence with entry into stationary phase by ppGpp, *Mol Microbiol* 33 [4], Seite 721-31.
- Hammer, B. K.; Tateda, E. S. und Swanson, M. S. (2002): A two-component regulator induces the transmission phenotype of stationary-phase *Legionella pneumophila*, *Mol Microbiol* 44 [1], Seite 107-18.
- Hammerschlag, M. R.; Roblin, P. M. und Bebear, C. M. (2001): Activity of telithromycin, a new ketolide antibacterial, against atypical and intracellular respiratory tract pathogens, *J Antimicrob Chemother* 48 Suppl T1, Seite 25-31.
- Hamoen, L. W.; Haijema, B.; Bijlsma, J. J.; Venema, G. und Lovett, C. M. (2001): The *Bacillus subtilis* competence transcription factor, ComK, overrides LexA-imposed transcriptional inhibition without physically displacing LexA, *J Biol Chem* 276 [46], Seite 42901-7.
- Hanahan, D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *J Mol Biol* 166 [4], Seite 557-80.
- Hayden, R. T.; Uhl, J. R.; Qian, X.; Hopkins, M. K.; Aubry, M. C.; Limper, A. H.; Lloyd, R. V. und Cockerill, F. R. (2001): Direct detection of *Legionella* species from bronchoalveolar lavage and open lung biopsy specimens: comparison of LightCycler PCR, in situ hybridization, direct fluorescence antigen detection, and culture, *J Clin Microbiol* 39 [7], Seite 2618-26.
- Hayes, C. S. und Sauer, R. T. (2003): Toxin-antitoxin pairs in bacteria: killers or stress regulators?, *Cell* 112 [1], Seite 2-4.
- Heinemann, J. A. und Sprague, G. F., Jr. (1989): Bacterial conjugative plasmids mobilize DNA transfer between bacteria and yeast, *Nature* 340 [6230], Seite 205-9.
- Helbig, J. H.; Bernander, S.; Castellani Pastoris, M.; Etienne, J.; Gaia, V.; Lauwers, S.; Lindsay, D.; Luck, P. C.; Marques, T.; Mentula, S.; Peeters, M. F.; Pelaz, C.; Struelens, M.; Uldum, S. A.; Wewalka, G. und Harrison, T. G. (2002): Pan-European study on culture-proven Legionnaires' disease: distribution of *Legionella pneumophila* serogroups and monoclonal subgroups, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 21 [10], Seite 710-6.
- Henderson, I. R.; Navarro-Garcia, F.; Desvaux, M.; Fernandez, R. C. und Ala'Aldeen, D. (2004): Type V protein secretion pathway: the autotransporter story, *Microbiol Mol Biol Rev* 68 [4], Seite 692-744.
- Hiramatsu, K.; Katayama, Y.; Yuzawa, H. und Ito, T. (2002): Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Int J Med Microbiol* 292 [2], Seite 67-74.
- Hochschild, A. und Lewis, M. (2009): The bacteriophage lambda CI protein finds an asymmetric solution, *Curr Opin Struct Biol* 19 [1], Seite 79-86.
- Hoess, R. H. und Abremski, K. (1985): Mechanism of strand cleavage and exchange in the Cre-lox site-specific recombination system, *J Mol Biol* 181 [3], Seite 351-62.
- Horwitz, M. A. und Maxfield, F. R. (1984): *Legionella pneumophila* inhibits acidification of its phagosome in human monocytes, *J Cell Biol* 99 [6], Seite 1936-43.
- Horwitz, M. A. und Silverstein, S. C. (1980): Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) multiples intracellularly in human monocytes, *J Clin Invest* 66 [3], Seite 441-50.
- Hubber, A. und Roy, C. R. (2010): Modulation of host cell function by *Legionella pneumophila* type IV effectors, *Annu Rev Cell Dev Biol* 26, Seite 261-83.
- Huber, K. E. und Waldor, M. K. (2002): Filamentous phage integration requires the host recombinases XerC and XerD, *Nature* 417 [6889], Seite 656-9.
- Hughes, K. T.; Youderian, P. und Simon, M. I. (1988): Phase variation in *Salmonella*: analysis of Hin recombinase and hix recombination site interaction in vivo, *Genes Dev* 2 [8], Seite 937-48.
- Isberg, R. R.; O'Connor, T. J. und Heidtman, M. (2009): The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cosy niche inside host cells, *Nat Rev Microbiol* 7 [1], Seite 13-24.
- Jacobi, S. und Heuner, K. (2003): Description of a putative type I secretion system in *Legionella pneumophila*, *Int J Med Microbiol* 293 [5], Seite 349-58.

- Jain, B.; Brand, B. C.; Luck, P. C.; Di Berardino, M.; Dimroth, P. und Hacker, J. (1996): An oxaloacetate decarboxylase homologue protein influences the intracellular survival of *Legionella pneumophila*, FEMS Microbiol Lett 145 [2], Seite 273-9.
- Jepras, R. I.; Fitzgeorge, R. B. und Baskerville, A. (1985): A comparison of virulence of two strains of *Legionella pneumophila* based on experimental aerosol infection of guinea-pigs, J Hyg (Lond) 95 [1], Seite 29-38.
- Juhas, M.; Crook, D. W. und Hood, D. W. (2008): Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence, Cell Microbiol 10 [12], Seite 2377-86.
- Juhas, M.; Power, P. M.; Harding, R. M.; Ferguson, D. J.; Dimopoulou, I. D.; Elamin, A. R.; Mohd-Zain, Z.; Hood, D. W.; Adegbola, R.; Erwin, A.; Smith, A.; Munson, R. S.; Harrison, A.; Mansfield, L.; Bentley, S. und Crook, D. W. (2007): Sequence and functional analyses of *Haemophilus* spp. genomic islands, Genome Biol 8 [11], Seite R237.
- Juhas, M.; van der Meer, J. R.; Gaillard, M.; Harding, R. M.; Hood, D. W. und Crook, D. W. (2009): Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution, FEMS Microbiol Rev 33 [2], Seite 376-93.
- Kado, C. I. (2000): The role of the T-pilus in horizontal gene transfer and tumorigenesis, Curr Opin Microbiol 3 [6], Seite 643-8.
- Katz, S. M. und Hammel, J. M. (1987): The effect of drying, heat, and pH on the survival of *Legionella pneumophila*, Ann Clin Lab Sci 17 [3], Seite 150-6.
- Kim, E. H.; Charpentier, X.; Torres-Urquidy, O.; McEvoy, M. M. und Rensing, C. (2009): The metal efflux island of *Legionella pneumophila* is not required for survival in macrophages and amoebas, FEMS Microbiol Lett 301 [2], Seite 164-70.
- Kirby, J. E.; Vogel, J. P.; Andrews, H. L. und Isberg, R. R. (1998): Evidence for pore-forming ability by *Legionella pneumophila*, Mol Microbiol 27 [2], Seite 323-36.
- Kwon, H. J.; Tirumalai, R.; Landy, A. und Ellenberger, T. (1997): Flexibility in DNA recombination: structure of the lambda integrase catalytic core, Science 276 [5309], Seite 126-31.
- La Scola, B.; Birtles, R. J.; Greub, G.; Harrison, T. J.; Ratcliff, R. M. und Raoult, D. (2004): *Legionella drancourtii* sp. nov., a strictly intracellular amoebal pathogen, Int J Syst Evol Microbiol 54 [Pt 3], Seite 699-703.
- Lautner, M. (2008): Molekularbiologische Untersuchungen am Typ IVA Sekretionssystem (Trb/Tra) von *Legionella pneumophila* Corby, Diplomarbeit, Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Lee, V. T. und Schneewind, O. (2001): Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections, Genes Dev 15 [14], Seite 1725-52.
- Leschziner, A. E. und Grindley, N. D. (2003): The architecture of the gammadelta resolvase crossover site synaptic complex revealed by using constrained DNA substrates, Mol Cell 12 [3], Seite 775-81.
- Lesic, B. und Carniel, E. (2005): Horizontal transfer of the high-pathogenicity island of *Yersinia pseudotuberculosis*, J Bacteriol 187 [10], Seite 3352-8.
- Liesegang, H.; Lemke, K.; Siddiqui, R. A. und Schlegel, H. G. (1993): Characterization of the inducible nickel and cobalt resistance determinant *cnr* from pMOL28 of *Alcaligenes eutrophus* CH34, J Bacteriol 175 [3], Seite 767-78.
- Liles, M. R.; Edelstein, P. H. und Cianciotto, N. P. (1999): The prepilin peptidase is required for protein secretion by and the virulence of the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*, Mol Microbiol 31 [3], Seite 959-70.
- Liles, M. R.; Viswanathan, V. K. und Cianciotto, N. P. (1998): Identification and temperature regulation of *Legionella pneumophila* genes involved in type IV pilus biogenesis and type II protein secretion, Infect Immun 66 [4], Seite 1776-82.
- Lindsay, D. S.; Abraham, W. H. und Fallon, R. J. (1994): Detection of *mip* gene by PCR for diagnosis of Legionnaires' disease, J Clin Microbiol 32 [12], Seite 3068-9.
- Liu, M. Y. und Romeo, T. (1997): The global regulator CsrA of *Escherichia coli* is a specific mRNA-binding protein, J Bacteriol 179 [14], Seite 4639-42.
- Lomma, M.; Gomez Valero, L.; Rusniok, C. und Buchrieser, C. (2009): *Legionella pneumophila* - Host Interactions: Insights Gained from Comparative Genomics and Cell Biology, Genome Dyn 6, Seite 170-86.
- Lorenz, M. G. und Wackernagel, W. (1994): Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment, Microbiol Rev 58 [3], Seite 563-602.

- Lucas, C. E.; Brown, E. und Fields, B. S. (2006): Type IV pili and type II secretion play a limited role in *Legionella pneumophila* biofilm colonization and retention, *Microbiology* 152 [Pt 12], Seite 3569-73.
- Machner, M. P. und Isberg, R. R. (2007): A bifunctional bacterial protein links GDI displacement to Rab1 activation, *Science* 318 [5852], Seite 974-7.
- Macnab, R. M. (1999): The bacterial flagellum: reversible rotary propellor and type III export apparatus, *J Bacteriol* 181 [23], Seite 7149-53.
- Maiques, E.; Ubeda, C.; Tormo, M. A.; Ferrer, M. D.; Lasa, I.; Novick, R. P. und Penades, J. R. (2007): Role of staphylococcal phage and SaPI integrase in intra- and interspecies SaPI transfer, *J Bacteriol* 189 [15], Seite 5608-16.
- Marra, A. und Shuman, H. A. (1989): Isolation of a *Legionella pneumophila* restriction mutant with increased ability to act as a recipient in heterospecific matings, *J Bacteriol* 171 [4], Seite 2238-40.
- McClain, M. S.; Hurley, M. C.; Brieland, J. K. und Engleberg, N. C. (1996): The *Legionella pneumophila* hel locus encodes intracellularly induced homologs of heavy-metal ion transporters of *Alcaligenes* spp, *Infect Immun* 64 [5], Seite 1532-40.
- McDade, J. E.; Shepard, C. C.; Fraser, D. W.; Tsai, T. R.; Redus, M. A. und Dowdle, W. R. (1977): Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease, *N Engl J Med* 297 [22], Seite 1197-203.
- McNally, C.; Hackman, B.; Fields, B. S. und Plouffe, J. F. (2000): Potential importance of *Legionella* species as etiologies in community acquired pneumonia (CAP), *Diagn Microbiol Infect Dis* 38 [2], Seite 79-82.
- Meier, P. und Wackernagel, W. (2005): Impact of *mutS* inactivation on foreign DNA acquisition by natural transformation in *Pseudomonas stutzeri*, *J Bacteriol* 187 [1], Seite 143-54.
- Moitoso de Vargas, L.; Pargellis, C. A.; Hasan, N. M.; Bushman, E. W. und Landy, A. (1988): Autonomous DNA binding domains of lambda integrase recognize two different sequence families, *Cell* 54 [7], Seite 923-9.
- Molmeret, M.; Zink, S. D.; Han, L.; Abu-Zant, A.; Asari, R.; Bitar, D. M. und Abu Kwaik, Y. (2004): Activation of caspase-3 by the Dot/Icm virulence system is essential for arrested biogenesis of the *Legionella*-containing phagosome, *Cell Microbiol* 6 [1], Seite 33-48.
- Molofsky, A. B.; Shetron-Rama, L. M. und Swanson, M. S. (2005): Components of the *Legionella pneumophila* flagellar regulon contribute to multiple virulence traits, including lysosome avoidance and macrophage death, *Infect Immun* 73 [9], Seite 5720-34.
- Molofsky, A. B. und Swanson, M. S. (2003): *Legionella pneumophila* CsrA is a pivotal repressor of transmission traits and activator of replication, *Mol Microbiol* 50 [2], Seite 445-61.
- Molofsky, A. B. und Swanson, M. S. (2004): Differentiate to thrive: lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle, *Mol Microbiol* 53 [1], Seite 29-40.
- Moore, D.; Maneewannakul, K.; Maneewannakul, S.; Wu, J. H.; Ippen-Ihler, K. und Bradley, D. E. (1990): Characterization of the F-plasmid conjugative transfer gene *traU*, *J Bacteriol* 172 [8], Seite 4263-70.
- Moore, M. R.; Pryor, M.; Fields, B.; Lucas, C.; Phelan, M. und Besser, R. E. (2006): Introduction of monochloramine into a municipal water system: impact on colonization of buildings by *Legionella* spp, *Appl Environ Microbiol* 72 [1], Seite 378-83.
- Muder, R. R. und Yu, V. L. (2002): Infection due to *Legionella* species other than *L. pneumophila*, *Clin Infect Dis* 35 [8], Seite 990-8.
- Nagai, H.; Kagan, J. C.; Zhu, X.; Kahn, R. A. und Roy, C. R. (2002): A bacterial guanine nucleotide exchange factor activates ARF on *Legionella* phagosomes, *Science* 295 [5555], Seite 679-82.
- Nagai, H. und Kubori, T. (2011): Type IVB Secretion Systems of *Legionella* and Other Gram-Negative Bacteria, *Front Microbiol* 2, Seite 136.
- Nagaraja, R. und Weisberg, R. A. (1990): Specificity determinants in the attachment sites of bacteriophages HK022 and lambda, *J Bacteriol* 172 [11], Seite 6540-50.
- Naito, M.; Sato, K.; Shoji, M.; Yukitake, H.; Ogura, Y.; Hayashi, T. und Nakayama, K. (2011): Characterization of the *Porphyromonas gingivalis* conjugative transposon CTnPg1: determination of the integration site and the genes essential for conjugal transfer, *Microbiology* 157 [Pt 7], Seite 2022-32.
- Nekrasov, S. V.; Agafonova, O. V.; Belogurova, N. G.; Delver, E. P. und Belogurov, A. A. (2007): Plasmid-encoded antirestriction protein ArdA can discriminate between type I methyltransferase and complete restriction-modification system, *J Mol Biol* 365 [2], Seite 284-97.
- Newsome, A. L.; Scott, T. M.; Benson, R. F. und Fields, B. S. (1998): Isolation of an amoeba naturally harboring a distinctive *Legionella* species, *Appl Environ Microbiol* 64 [5], Seite 1688-93.

- Nielsen, K.; Bangsberg, J. M. und Hoiby, N. (2000): Susceptibility of *Legionella* species to five antibiotics and development of resistance by exposure to erythromycin, ciprofloxacin, and rifampicin, *Diagn Microbiol Infect Dis* 36 [1], Seite 43-8.
- Nora, T.; Lomma, M.; Gomez-Valero, L. und Buchrieser, C. (2009): Molecular mimicry: an important virulence strategy employed by *Legionella pneumophila* to subvert host functions, *Future Microbiol* 4 [6], Seite 691-701.
- Nunes-Duby, S. E.; Kwon, H. J.; Tirumalai, R. S.; Ellenberger, T. und Landy, A. (1998): Similarities and differences among 105 members of the Int family of site-specific recombinases, *Nucleic Acids Res* 26 [2], Seite 391-406.
- Ogata, H.; La Scola, B.; Audic, S.; Renesto, P.; Blanc, G.; Robert, C.; Fournier, P. E.; Claverie, J. M. und Raoult, D. (2006): Genome sequence of *Rickettsia bellii* illuminates the role of amoebae in gene exchanges between intracellular pathogens, *PLoS Genet* 2 [5], Seite e76.
- Oldham, L. J. und Rodgers, F. G. (1985): Adhesion, penetration and intracellular replication of *Legionella pneumophila*: an in vitro model of pathogenesis, *J Gen Microbiol* 131 [4], Seite 697-706.
- Olivares, E. C.; Hollis, R. P. und Calos, M. P. (2001): Phage R4 integrase mediates site-specific integration in human cells, *Gene* 278 [1-2], Seite 167-76.
- Orrison, L. H.; Cherry, W. B.; Tyndall, R. L.; Fliermans, C. B.; Gough, S. B.; Lambert, M. A.; McDougal, L. K.; Bibb, W. F. und Brenner, D. J. (1983): *Legionella oakridgensis*: unusual new species isolated from cooling tower water, *Appl Environ Microbiol* 45 [2], Seite 536-45.
- Ott, C. (2009): Untersuchungen zum Vorkommen von Genominseln in Umwelt- und Patientenisolaten der Gattung *Legionella*., Diplomarbeit, Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Pan, X.; Luhrmann, A.; Satoh, A.; Laskowski-Arce, M. A. und Roy, C. R. (2008): Ankyrin repeat proteins comprise a diverse family of bacterial type IV effectors, *Science* 320 [5883], Seite 1651-4.
- Pearce, M. M. und Cianciotto, N. P. (2009): *Legionella pneumophila* secretes an endoglucanase that belongs to the family-5 of glycosyl hydrolases and is dependent upon type II secretion, *FEMS Microbiol Lett* 300 [2], Seite 256-64.
- Pham, P.; Rangarajan, S.; Woodgate, R. und Goodman, M. F. (2001): Roles of DNA polymerases V and II in SOS-induced error-prone and error-free repair in *Escherichia coli*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 [15], Seite 8350-4.
- Pierson, L. S., 3rd und Kahn, M. L. (1987): Integration of satellite bacteriophage P4 in *Escherichia coli*. DNA sequences of the phage and host regions involved in site-specific recombination, *J Mol Biol* 196 [3], Seite 487-96.
- Polesky, A. H.; Ross, J. T.; Falkow, S. und Tompkins, L. S. (2001): Identification of *Legionella pneumophila* genes important for infection of amoebas by signature-tagged mutagenesis, *Infect Immun* 69 [2], Seite 977-87.
- Pugsley, A. P.; Francetic, O.; Hardie, K.; Possot, O. M.; Sauvonnnet, N. und Seydel, A. (1997): Pullulanase: model protein substrate for the general secretory pathway of gram-negative bacteria, *Folia Microbiol (Praha)* 42 [3], Seite 184-92.
- Qin, T.; Cui, Y.; Cen, Z.; Liang, T.; Ren, H.; Yang, X.; Zhao, X.; Liu, Z.; Xu, L.; Li, D.; Song, Y.; Yang, R.; Shao, Z. und Song, Y. (2012): Draft genome sequences of two *Legionella dumoffii* strains, TEX-KL and NY-23, *J Bacteriol* 194 [5], Seite 1251-2.
- Qin, T.; Hirakawa, H.; Iida, K.; Oshima, K.; Hattori, M.; Tashiro, K.; Kuhara, S. und Yoshida, S. (2007): Complete nucleotide sequence of pLD-TEX-KL, a 66-kb plasmid of *Legionella dumoffii* TEX-KL strain, *Plasmid* 58 [3], Seite 261-8.
- Ragaz, C.; Pietsch, H.; Urwyler, S.; Tiaden, A.; Weber, S. S. und Hilbi, H. (2008): The *Legionella pneumophila* phosphatidylinositol-4 phosphate-binding type IV substrate SidC recruits endoplasmic reticulum vesicles to a replication-permissive vacuole, *Cell Microbiol* 10 [12], Seite 2416-33.
- Rajeev, L.; Malanowska, K. und Gardner, J. F. (2009): Challenging a paradigm: the role of DNA homology in tyrosine recombinase reactions, *Microbiol Mol Biol Rev* 73 [2], Seite 300-9.
- Rankin, S.; Li, Z. und Isberg, R. R. (2002): Macrophage-induced genes of *Legionella pneumophila*: protection from reactive intermediates and solute imbalance during intracellular growth, *Infect Immun* 70 [7], Seite 3637-48.
- Rasis, M. und Segal, G. (2009): The LetA-RsmYZ-CsrA regulatory cascade, together with RpoS and PmrA, post-transcriptionally regulates stationary phase activation of *Legionella pneumophila* Icm/Dot effectors, *Mol Microbiol* 72 [4], Seite 995-1010.

- Ratcliff, R. M.; Lanser, J. A.; Manning, P. A. und Heuzenroeder, M. W. (1998): Sequence-based classification scheme for the genus *Legionella* targeting the mip gene, J Clin Microbiol 36 [6], Seite 1560-7.
- Ravatn, R.; Studer, S.; Zehnder, A. J. und van der Meer, J. R. (1998): Int-B13, an unusual site-specific recombinase of the bacteriophage P4 integrase family, is responsible for chromosomal insertion of the 105-kilobase clc element of Pseudomonas sp. Strain B13, J Bacteriol 180 [21], Seite 5505-14.
- Reed, R. R. und Grindley, N. D. (1981): Transposon-mediated site-specific recombination in vitro: DNA cleavage and protein-DNA linkage at the recombination site, Cell 25 [3], Seite 721-8.
- Ridenour, D. A.; Cirillo, S. L.; Feng, S.; Samrakandi, M. M. und Cirillo, J. D. (2003): Identification of a gene that affects the efficiency of host cell infection by *Legionella pneumophila* in a temperature-dependent fashion, Infect Immun 71 [11], Seite 6256-63.
- Robertson, C. A. und Nash, H. A. (1988): Bending of the bacteriophage lambda attachment site by Escherichia coli integration host factor, J Biol Chem 263 [8], Seite 3554-7.
- Robson, A. und Collinson, I. (2006): The structure of the Sec complex and the problem of protein translocation, EMBO Rep 7 [11], Seite 1099-103.
- Rodgers, F. G.; Greaves, P. W.; Macrae, A. D. und Lewis, M. J. (1980): Electron microscopic evidence of flagella and pili on Legionella pneumophila, J Clin Pathol 33 [12], Seite 1184-8.
- Rogers, J.; Dowsett, A. B.; Dennis, P. J.; Lee, J. V. und Keevil, C. W. (1994): Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of Legionella pneumophila in a model potable water system containing complex microbial flora, Appl Environ Microbiol 60 [5], Seite 1585-92.
- Romeo, T. (1998): Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB, Mol Microbiol 29 [6], Seite 1321-30.
- Ross, W.; Landy, A.; Kikuchi, Y. und Nash, H. (1979): Interaction of int protein with specific sites on lambda att DNA, Cell 18 [2], Seite 297-307.
- Rossier, O. und Cianciotto, N. P. (2001): Type II protein secretion is a subset of the PilD-dependent processes that facilitate intracellular infection by *Legionella pneumophila*, Infect Immun 69 [4], Seite 2092-8.
- Rossier, O. und Cianciotto, N. P. (2005): The *Legionella pneumophila* tatB gene facilitates secretion of phospholipase C, growth under iron-limiting conditions, and intracellular infection, Infect Immun 73 [4], Seite 2020-32.
- Rossier, O.; Starkenburg, S. R. und Cianciotto, N. P. (2004): *Legionella pneumophila* type II protein secretion promotes virulence in the A/J mouse model of Legionnaires' disease pneumonia, Infect Immun 72 [1], Seite 310-21.
- Rowbotham, T. J. (1998): Isolation of Legionella pneumophila serogroup 1 from human feces with use of amebic cocultures, Clin Infect Dis 26 [2], Seite 502-3.
- Roy, C. R.; Berger, K. H. und Isberg, R. R. (1998): *Legionella pneumophila* DotA protein is required for early phagosome trafficking decisions that occur within minutes of bacterial uptake, Mol Microbiol 28 [3], Seite 663-74.
- Sadowski, P. (1986): Site-specific recombinases: changing partners and doing the twist, J Bacteriol 165 [2], Seite 341-7.
- Sahr, T.; Bruggemann, H.; Jules, M.; Lomma, M.; Albert-Weissenberger, C.; Cazalet, C. und Buchrieser, C. (2009): Two small ncRNAs jointly govern virulence and transmission in Legionella pneumophila, Mol Microbiol 72 [3], Seite 741-62.
- Sakai, D. und Komano, T. (2002): Genes required for plasmid R64 thin-pilus biogenesis: identification and localization of products of the pilK, pilM, pilO, pilP, pilR, and pilT genes, J Bacteriol 184 [2], Seite 444-51.
- Sarkar, D.; Radman-Livaja, M. und Landy, A. (2001): The small DNA binding domain of lambda integrase is a context-sensitive modulator of recombinase functions, EMBO J 20 [5], Seite 1203-12.
- Schmidt, B.; Rahfeld, J.; Schierhorn, A.; Ludwig, B.; Hacker, J. und Fischer, G. (1994): A homodimer represents an active species of the peptidyl-prolyl cis/trans isomerase FKBP25mem from Legionella pneumophila, FEBS Lett 352 [2], Seite 185-90.
- Schroder, G. und Lanka, E. (2003): TraG-like proteins of type IV secretion systems: functional dissection of the multiple activities of TraG (RP4) and TrwB (R388), J Bacteriol 185 [15], Seite 4371-81.

- Schroeder, G. N.; Petty, N. K.; Mousnier, A.; Harding, C. R.; Vogrin, A. J.; Wee, B.; Fry, N. K.; Harrison, T. G.; Newton, H. J.; Thomson, N. R.; Beatson, S. A.; Dougan, G.; Hartland, E. L. und Frankel, G. (2010): *Legionella pneumophila* strain 130b possesses a unique combination of type IV secretion systems and novel Dot/Icm secretion system effector proteins, *J Bacteriol* 192 [22], Seite 6001-16.
- Segal, G.; Feldman, M. und Zusman, T. (2005): The Icm/Dot type-IV secretion systems of *Legionella pneumophila* and *Coxiella burnetii*, *FEMS Microbiol Rev* 29 [1], Seite 65-81.
- Segal, G.; Purcell, M. und Shuman, H. A. (1998): Host cell killing and bacterial conjugation require overlapping sets of genes within a 22-kb region of the *Legionella pneumophila* genome, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 [4], Seite 1669-74.
- Segal, G.; Russo, J. J. und Shuman, H. A. (1999): Relationships between a new type IV secretion system and the icm/dot virulence system of *Legionella pneumophila*, *Mol Microbiol* 34 [4], Seite 799-809.
- Segal, G. und Shuman, H. A. (1997): Characterization of a new region required for macrophage killing by *Legionella pneumophila*, *Infect Immun* 65 [12], Seite 5057-66.
- Sexton, J. A. und Vogel, J. P. (2002): Type IVB secretion by intracellular pathogens, *Traffic* 3 [3], Seite 178-85.
- Smillie, C.; Garcillan-Barcia, M. P.; Francia, M. V.; Rocha, E. P. und de la Cruz, F. (2010): Mobility of plasmids, *Microbiol Mol Biol Rev* 74 [3], Seite 434-52.
- Smith, H. O.; Tomb, J. F.; Dougherty, B. A.; Fleischmann, R. D. und Venter, J. C. (1995): Frequency and distribution of DNA uptake signal sequences in the *Haemophilus influenzae* Rd genome, *Science* 269 [5223], Seite 538-40.
- Smith, M. C. und Thorpe, H. M. (2002): Diversity in the serine recombinases, *Mol Microbiol* 44 [2], Seite 299-307.
- Soderberg, M. A.; Rossier, O. und Cianciotto, N. P. (2004): The type II protein secretion system of *Legionella pneumophila* promotes growth at low temperatures, *J Bacteriol* 186 [12], Seite 3712-20.
- Stark, W. M.; Boocock, M. R. und Sherratt, D. J. (1992): Catalysis by site-specific recombinases, *Trends Genet* 8 [12], Seite 432-9.
- Steinert, M. und Heuner, K. (2005): Dictyostelium as host model for pathogenesis, *Cell Microbiol* 7 [3], Seite 307-14.
- Stoll, S. M.; Ginsburg, D. S. und Calos, M. P. (2002): Phage TP901-1 site-specific integrase functions in human cells, *J Bacteriol* 184 [13], Seite 3657-63.
- Stone, B. J. und Abu Kwaik, Y. (1998): Expression of multiple pili by *Legionella pneumophila*: identification and characterization of a type IV pilin gene and its role in adherence to mammalian and protozoan cells, *Infect Immun* 66 [4], Seite 1768-75.
- Stone, B. J. und Kwaik, Y. A. (1999): Natural competence for DNA transformation by *Legionella pneumophila* and its association with expression of type IV pili, *J Bacteriol* 181 [5], Seite 1395-402.
- Stout, J. E.; Arnold, B. und Yu, V. L. (1998): Comparative activity of ciprofloxacin, ofloxacin, levofloxacin, and erythromycin against *Legionella* species by broth microdilution and intracellular susceptibility testing in HL-60 cells, *Diagn Microbiol Infect Dis* 30 [1], Seite 37-43.
- Stout, J. E.; Sens, K.; Mietzner, S.; Obman, A. und Yu, V. L. (2005): Comparative activity of quinolones, macrolides and ketolides against *Legionella* species using in vitro broth dilution and intracellular susceptibility testing, *Int J Antimicrob Agents* 25 [4], Seite 302-7.
- Stout, J. E. und Yu, V. L. (2003): Experiences of the first 16 hospitals using copper-silver ionization for *Legionella* control: implications for the evaluation of other disinfection modalities, *Infect Control Hosp Epidemiol* 24 [8], Seite 563-8.
- Swanson, M. S. und Isberg, R. R. (1995): Association of *Legionella pneumophila* with the macrophage endoplasmic reticulum, *Infect Immun* 63 [9], Seite 3609-20.
- Thompson, J. F.; de Vargas, L. M.; Skinner, S. E. und Landy, A. (1987): Protein-protein interactions in a higher-order structure direct lambda site-specific recombination, *J Mol Biol* 195 [3], Seite 481-93.
- Thorpe, H. M.; Wilson, S. E. und Smith, M. C. (2000): Control of directionality in the site-specific recombination system of the *Streptomyces* phage phiC31, *Mol Microbiol* 38 [2], Seite 232-41.
- Tiaden, A.; Spirig, T.; Sahr, T.; Walti, M. A.; Boucke, K.; Buchrieser, C. und Hilbi, H. (2010): The autoinducer synthase LqsA and putative sensor kinase LqsS regulate phagocyte interactions, extracellular filaments and a genomic island of *Legionella pneumophila*, *Environ Microbiol* 12 [5], Seite 1243-59.
- Tilney, L. G.; Harb, O. S.; Connelly, P. S.; Robinson, C. G. und Roy, C. R. (2001): How the parasitic bacterium *Legionella pneumophila* modifies its phagosome and transforms it into rough ER: implications for conversion of plasma membrane to the ER membrane, *J Cell Sci* 114 [Pt 24], Seite 4637-50.

- Trieu-Cuot, P.; Carlier, C. und Courvalin, P. (1988): Conjugative plasmid transfer from *Enterococcus faecalis* to *Escherichia coli*, *J Bacteriol* 170 [9], Seite 4388-91.
- Tsai, T. F.; Finn, D. R.; Plikaytis, B. D.; McCauley, W.; Martin, S. M. und Fraser, D. W. (1979): Legionnaires' disease: clinical features of the epidemic in Philadelphia, *Ann Intern Med* 90 [4], Seite 509-17.
- Vogel, J. P.; Andrews, H. L.; Wong, S. K. und Isberg, R. R. (1998): Conjugative transfer by the virulence system of *Legionella pneumophila*, *Science* 279 [5352], Seite 873-6.
- Wagner, C.; Khan, A. S.; Kamphausen, T.; Schmausser, B.; Unal, C.; Lorenz, U.; Fischer, G.; Hacker, J. und Steinert, M. (2007): Collagen binding protein Mip enables *Legionella pneumophila* to transmigrate through a barrier of NCI-H292 lung epithelial cells and extracellular matrix, *Cell Microbiol* 9 [2], Seite 450-62.
- Wallden, K.; Williams, R.; Yan, J.; Lian, P. W.; Wang, L.; Thalassinou, K.; Orlova, E. V. und Waksman, G. (2012): Structure of the VirB4 ATPase, alone and bound to the core complex of a type IV secretion system, *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 [28], Seite 11348-53.
- Waters, V. L. (2001): Conjugation between bacterial and mammalian cells, *Nat Genet* 29 [4], Seite 375-6.
- Williams, K. P. (2002): Integration sites for genetic elements in prokaryotic tRNA and tmRNA genes: sublocation preference of integrase subfamilies, *Nucleic Acids Res* 30 [4], Seite 866-75.
- Wojciak, J. M.; Sarkar, D.; Landy, A. und Clubb, R. T. (2002): Arm-site binding by lambda -integrase: solution structure and functional characterization of its amino-terminal domain, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 [6], Seite 3434-9.
- Yin, S.; Bushman, W. und Landy, A. (1985): Interaction of the lambda site-specific recombination protein Xis with attachment site DNA, *Proc Natl Acad Sci U S A* 82 [4], Seite 1040-4.
- Yu, V. L.; Plouffe, J. F.; Pastoris, M. C.; Stout, J. E.; Schousboe, M.; Widmer, A.; Summersgill, J.; File, T.; Heath, C. M.; Paterson, D. L. und Chereschsky, A. (2002): Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey, *J Infect Dis* 186 [1], Seite 127-8.
- Zambryski, P.; Holsters, M.; Kruger, K.; Depicker, A.; Schell, J.; Van Montagu, M. und Goodman, H. M. (1980): Tumor DNA structure in plant cells transformed by *A. tumefaciens*, *Science* 209 [4463], Seite 1385-91.

Anhang

Tab. 21: Optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von *L. pneumophila* Corby „Wildtyp“ und den Deletionsmutanten $\Delta int-1$, $\Delta lvrABC$ und $\Delta lvrR$. Wachstum in YEB-Medium bei 37°C. Gezeigt sind Doppelansätze.

Zeit [h]	<i>Lp</i> Corby		$\Delta int-1$		$\Delta lvrABC$		$\Delta lvrR$	
0	0,318	0,325	0,366	0,361	0,368	0,336	0,334	0,322
2	0,562	0,549	0,566	0,567	0,568	0,543	0,493	0,499
4	1,088	1,075	0,953	0,972	1,001	1,006	0,773	0,798
6	1,673	1,647	1,560	1,573	1,563	1,594	1,231	1,275
8	1,877	1,848	1,859	1,870	1,781	1,816	1,716	1,735
10	2,030	2,006	2,041	2,048	1,957	1,982	1,874	1,896
12	2,096	2,079	2,142	2,140	2,027	2,046	-	-
22	2,216	2,217	2,312	2,268	2,243	2,224	2,164	2,162
25	2,195	2,207	2,293	2,299	2,257	2,201	2,157	2,163
30	2,182	2,176	2,257	2,266	2,221	2,195	2,125	2,137

Tab. 22: Optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von *L. pneumophila* Corby „Wildtyp“ und den Deletionsmutanten $\Delta lpc1833$, $\Delta lpc1884$ und $\Delta lpc2123$. Wachstum in YEB-Medium bei 37°C. Gezeigt sind Doppelansätze.

Zeit [h]	<i>Lp</i> Corby		$\Delta lpc1833$		$\Delta lpc1884$		$\Delta lpc2123$	
0	0,382	0,344	0,355	0,384	0,365	0,348	0,372	0,348
2	0,580	0,536	0,550	0,573	0,559	0,510	0,577	0,531
4	0,940	0,912	0,993	0,925	0,989	0,764	0,985	0,855
6	1,391	1,414	1,555	1,378	1,540	1,116	1,478	1,303
8	1,777	1,787	1,841	1,775	1,836	1,547	1,819	1,724
10	1,923	1,962	2,004	1,933	1,996	1,829	1,970	1,909
12	2,032	2,040	2,063	2,032	2,062	1,949	2,049	2,017
24	2,090	2,101	2,149	2,023	2,197	2,113	2,114	2,078
30	1,997	2,048	2,105	1,966	2,142	2,062	2,056	2,016

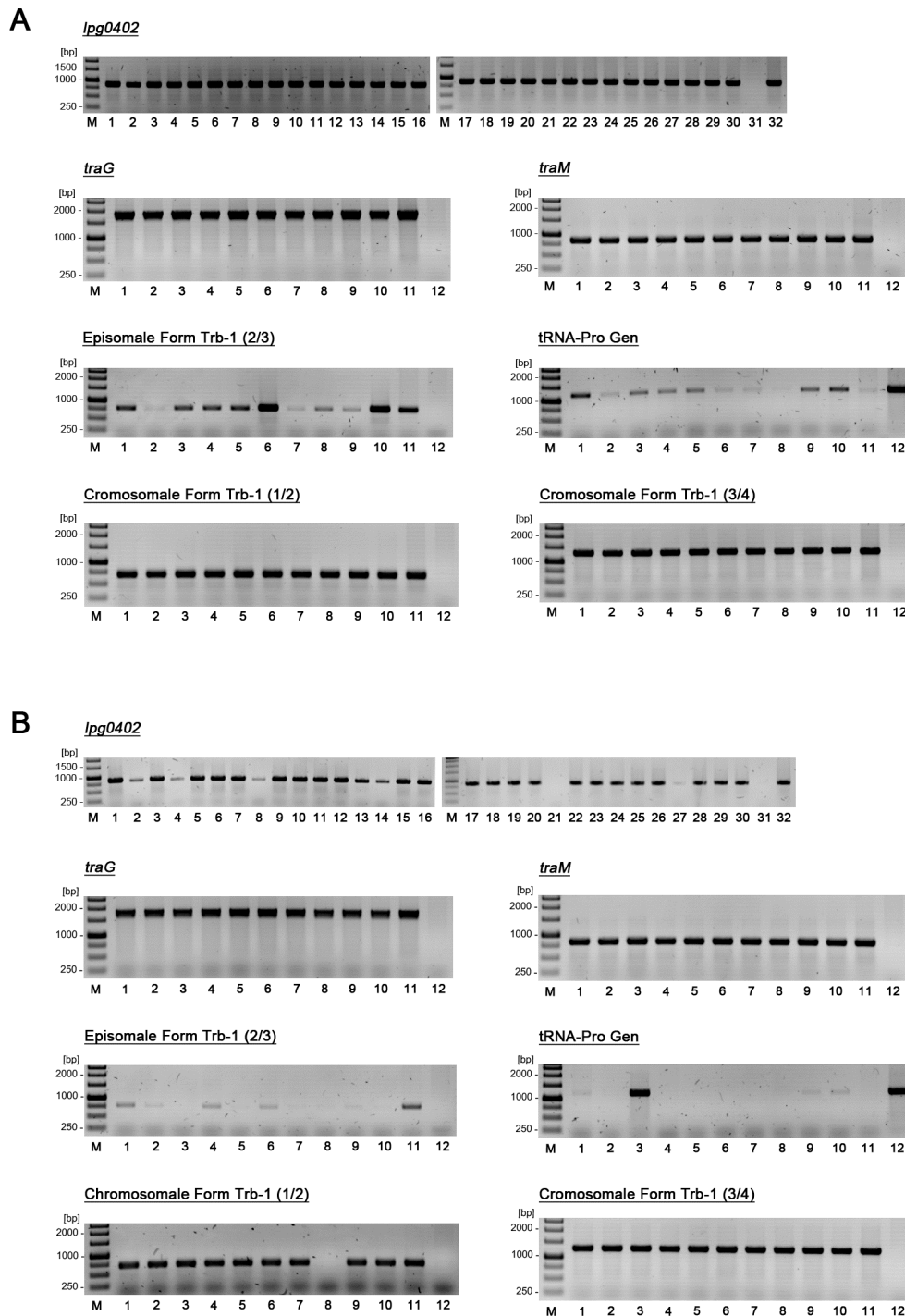


Abb. 36: PCR-Analyse der Transkonjuganten (TK) aus der Konjugation der genomischen Insel Trb-1 in *Lp* Phil-I JR32 (Rezipient). Als Donor fungierten die der Stamm (A) *Lp* Corby WT^o und (B) die Integrase Mutante $\Delta int-1$. Die TK wurden zunächst auf das spezifische *Lp* Phil-I Gen *lpg0402* (*lpg0402*-U/*lpg0402*-R) und die Trb-1 Gene *traG* (*lpc2801*; TraG-F/TraG-R) und *traM* (*lpc2791*; TraM-F/TraM-R) kontrolliert. Anschließend wurden die TK auf die episomale zirkuläre Form (2/3; *trb-2/trb-3*), das intakte tRNA^{Pro} Gen (*lpg0524*) von *Lp* Phil-I JR32 (1/4; *trb-1/trb-4*) und die chromosomale Form (1/2 und 3/4; *trb-1/trb-2* und *trb-3/trb-4*) von Trb-1 hin untersucht. Die Zahlen 1-30 bzw. 1-10 unter den Abbildungen entsprechen jeweils den TK 1-30 und 1-10; 31=Donor (A) *Lp* Corby WT^o oder (B) $\Delta int-1$ und 32=Rezipient *Lp* Phil-I JR32. Die PCR-Produkte wurden jeweils in 35 Zyklen amplifiziert.

Tab. 23: Ergebnisse der qPCR aus der Analyse der episomalen Form von Trb-1 beim „Wildtyp“ *Lp Corby* und den Deletionsmutanten $\Delta int-1$, $\Delta lvrRABC$ und $\Delta lvrR$. Die Bildung der episomalen Form von Trb-1 wurde während der exponentiellen (E) und stationären (S) Phase untersucht. Die Signifikanz (P-Werte; $P < 0,05$) wurde mit dem t-Test bestimmt und ist wie folgt angegeben: * $< 0,001$; ** $< 0,01$; * $< 0,05$; „ns“ $> 0,05$, nicht signifikant.**

	WT			$\Delta int-1$			$\Delta lvrRABC$			$\Delta lvrR$		
	Mittelwert	SEM	P-Wert	Mittelwert	SEM	P-Wert	Mittelwert	SEM	P-Wert	Mittelwert	SEM	P-Wert
Trb-1_{ci} vs. <i>flaA</i>												
E Phase	$1,065 \times 10^{-4}$	$4,865 \times 10^{-6}$	***	$4,054 \times 10^{-6}$	$1,001 \times 10^{-6}$	***	$1,472 \times 10^{-2}$	$5,315 \times 10^{-4}$	***	$1,287 \times 10^{-2}$	$2,184 \times 10^{-3}$	***
S Phase	$2,122 \times 10^{-4}$	$2,451 \times 10^{-5}$	***	$4,105 \times 10^{-6}$	$1,231 \times 10^{-6}$	***	$1,376 \times 10^{-2}$	$6,307 \times 10^{-4}$	***	$1,904 \times 10^{-2}$	$1,861 \times 10^{-3}$	***
Δ vs. WT												
E Phase	-	-	-	0,034	0,009	***	146,800	11,500	***	68,118	9,664	***
S Phase	-	-	-	0,029	0,014	***	74,243	27,986	***	125,092	35,614	***
S vs. E Phase	1,867	0,653	*	1,691	0,868	ns	0,839	0,241	ns	2,916	0,627	***

Tab. 24: Ergebnisse der qPCR aus der Analyse der episomalen Formen A, B und AB der von LpcGI-2, beim „Wildtyp“ *Lp Corby*. Als Template für die qPCR diente chromosomale DNA aus der exponentiellen (E) und stationären (S) Phase. Die Signifikanz (P-Werte; $P < 0,05$) wurde mit dem t-Test bestimmt und ist wie folgt angegeben: *** $< 0,001$; ** $< 0,01$; * $< 0,05$; „ns“ $> 0,05$, nicht signifikant.

	Episomale Form	Wachstumsphase	WT		
			Mittelwert	SEM	P-Wert
LpcGI-2 vs. flaA	A	E	$2,436 \times 10^{-3}$	$1,447 \times 10^{-3}$	***
		S	$1,283 \times 10^{-3}$	$5,819 \times 10^{-4}$	***
	B	E	$7,578 \times 10^{-7}$	$4,007 \times 10^{-8}$	***
		S	$8,174 \times 10^{-7}$	$3,702 \times 10^{-7}$	***
	AB	E	$4,655 \times 10^{-7}$	$1,043 \times 10^{-7}$	***
		S	$6,639 \times 10^{-7}$	$2,383 \times 10^{-7}$	***
B bzw. AB vs. A	B	E	$5,475 \times 10^{-4}$	$2,036 \times 10^{-4}$	**
		S	$9,465 \times 10^{-4}$	$5,518 \times 10^{-4}$	**
	AB	E	$2,983 \times 10^{-4}$	$1,037 \times 10^{-4}$	**
		S	$7,756 \times 10^{-4}$	$3,829 \times 10^{-4}$	**
S vs. E Phase	A	-	0,968	0,304	ns
	B	-	1,278	0,141	ns
	AB	-	2,064	0,594	*

Tab. 25: Ergebnisse der qPCR aus der Analyse der episomalen Formen A, B und AB der von LpcGI-2, bei den Integrase Mutanten $\Delta lpc1833$, $\Delta lpc1884$ und $\Delta lpc2123$. Als Template für die qPCR diente chromosomale DNA aus der exponentiellen (E) und stationären (S) Phase. Die Signifikanz (P-Werte; $P < 0,05$) wurde mit dem t-Test bestimmt und ist wie folgt angegeben: * $< 0,001$; ** $< 0,01$; * $< 0,05$; „ns“ $> 0,05$, nicht signifikant.**

			$\Delta lpc1833$			$\Delta lpc1884$			$\Delta lpc2123$		
Episomale Form	Wachstumsphase		Mittelwert	SEM	P-Wert	Mittelwert	SEM	P-Wert	Mittelwert	SEM	P-Wert
LpcGI-2 vs. flaA	A	E	$5,286 \times 10^{-7}$	$9,347 \times 10^{-8}$	***	$2,177 \times 10^{-3}$	$1,116 \times 10^{-3}$	***	$1,162 \times 10^{-3}$	$3,354 \times 10^{-4}$	***
		S	$5,199 \times 10^{-7}$	$1,171 \times 10^{-8}$	***	$1,432 \times 10^{-3}$	$6,374 \times 10^{-4}$	***	$6,778 \times 10^{-4}$	$1,804 \times 10^{-4}$	***
	B	E	$1,164 \times 10^{-6}$	$3,076 \times 10^{-7}$	***	$1,434 \times 10^{-6}$	$1,326 \times 10^{-7}$	***	$1,985 \times 10^{-6}$	$1,249 \times 10^{-7}$	***
		S	$6,412 \times 10^{-7}$	$1,981 \times 10^{-7}$	***	$7,393 \times 10^{-7}$	$7,467 \times 10^{-8}$	***	$1,054 \times 10^{-6}$	$1,364 \times 10^{-7}$	***
	AB	E	$4,807 \times 10^{-7}$	$9,089 \times 10^{-8}$	***	$5,434 \times 10^{-7}$	$1,383 \times 10^{-7}$	***	$3,941 \times 10^{-7}$	$9,960 \times 10^{-8}$	***
		S	$5,321 \times 10^{-7}$	$1,291 \times 10^{-7}$	***	$6,185 \times 10^{-7}$	$1,450 \times 10^{-7}$	***	$5,441 \times 10^{-7}$	$9,086 \times 10^{-8}$	***
Δ vs. WT	A	E	$2,535 \times 10^{-4}$	$7,198 \times 10^{-5}$	**	1,227	0,448	ns	0,831	0,503	ns
		S	$6,318 \times 10^{-4}$	$2,456 \times 10^{-4}$	**	1,277	0,308	ns	0,674	0,340	ns
	B	E	1,137	0,120	ns	2,190	0,495	***	2,693	0,860	***
		S	0,926	0,192	ns	1,234	0,262	ns	1,534	0,578	ns
	AB	E	0,868	0,179	ns	1,375	0,313	ns	0,922	0,314	ns
		S	0,886	0,117	ns	1,121	0,265	ns	0,813	0,168	*
B bzw. AB vs. A	B	E	2,374	0,675	*	$1,103 \times 10^{-3}$	$4,467 \times 10^{-4}$	***	$2,078 \times 10^{-3}$	$6,610 \times 10^{-4}$	***
		S	1,219	0,352	ns	$8,390 \times 10^{-4}$	$4,220 \times 10^{-4}$	***	$1,900 \times 10^{-3}$	$7,476 \times 10^{-4}$	***
	AB	E	0,904	0,044	ns	$3,343 \times 10^{-4}$	$1,052 \times 10^{-4}$	***	$3,635 \times 10^{-4}$	$7,929 \times 10^{-5}$	***
		S	1,014	0,225	ns	$7,274 \times 10^{-4}$	$4,448 \times 10^{-4}$	***	$9,554 \times 10^{-4}$	$3,358 \times 10^{-4}$	***
S vs. E Phase	A	-	2,219	0,935	**	0,980	0,156	ns	0,802	0,161	ns
	B	-	1,006	0,080	ns	0,733	0,128	ns	0,690	0,017	ns
	AB	-	2,230	0,669	**	1,831	0,713	ns	1,964	0,395	***

Tab. 26: Aufbau der genomischen Insel LpcGI-2 bei *L. pneumophila* Corby. Für Gene mit unbekannter Funktion, wurden Gene anderer *Legionella* und „nicht“-*Legionella* Stämme angegeben, die in ihrer Proteinsequenz die höchste Übereinstimmung aufwiesen. *lpc*=*Lp* Corby; *lpp*=*Lp* Paris; *lpg*=*Lp* Phil-I; *lpl*=*Lp* Lens; *lpa*=*Lp* Alcoy; *lpw*=*Lp* 130b; *lp12*=*Lp* ATCC 43250; *llo*=*L. longbeachae* NSW150; *ldg*=*L. drancourtii* LLAP12.

<i>lpc</i>	Name	Mögliche Funktion bzw. ähnliche Proteine
-	Repeat	<i>attL</i>
1833	<i>int</i>	Integrase, putativ; ähnlich zu <i>lpp2312</i>
1834		ähnlich zu <i>lpp2313</i>
1835		Prolin/Betain Transporter Protein, ähnlich zu <i>lpp2314</i>
1836		ähnlich zu <i>lpw_21221</i>
1837		Lypolytisches Enzym, ähnlich zu <i>lp12_2062</i>
1838		Transkriptionaler Regulator, Responseregulator, enthält eine „CheY-like receiver“ und eine HTH DNA-bindende Domäne, ähnlich zu <i>lp12_2063</i>
1839		ähnlich zu <i>lp12_2064</i>
1840		ähnlich zu <i>lp12_2065</i>
1841		ähnlich zu <i>lp12_2066</i>
1842		Putative Cadmium Efflux ATPase, ähnlich zu <i>lp12_2067</i>
1843		Cadmium Efflux ATPase, ähnlich zu <i>lpg1010</i>
1844		ähnlich zu <i>lpc_2266</i> ; <i>lpa_01547</i>
1845		ähnlich zu <i>lp12_2069</i>
1846	<i>cada</i>	Cadmium Translokation P-Typ ATPase, ähnlich zu <i>lp12_2070</i>
1847	<i>hela</i>	Cobalt/Zink/Cadmium Efflux RND Transporter, Permease Protein HelA, ähnlich zu <i>lp12_2071</i>
1848	<i>helB</i>	Kation Efflux System HelB, ähnlich zu <i>lp12_2072</i>
1849	<i>helC</i>	Cobalt/Zink/Cadmium Efflux RND Transporter, Außenmembranprotein HelC, ähnlich zu <i>lp12_2073</i>
1850		Reverse Transkriptase
1851		hypothetisches Protein
1852		ähnlich zu <i>llo_0765</i>
1853		ähnlich zu <i>llo_1727</i>
1854		ähnlich zu <i>NH8B_0948</i> (<i>Pseudogulbenkiania</i> sp. NH8B)
1855		ähnlich zur RNA-abhängigen DNA Polymerase (<i>Prevotella</i> sp. Oral taxon 306 str. F0472)
1856		Transposase IS4, ähnlich zu <i>lp10192</i>
1857	<i>prpA</i>	Phage Repressor, ähnlich zu <i>lp12_2074</i>
1858	<i>lvrA</i>	<i>Legionella vir</i> Region Protein LvrA, ähnlich zu <i>lp12_2075</i>
1859	<i>lvrB</i>	<i>Legionella vir</i> Region Protein LvrB, ähnlich zu <i>lp12_2076</i>
1860	<i>lvrC</i>	<i>Legionella vir</i> Region Protein LvrC; ähnlich zum „Carbon storage regulator“ CsrA, ähnlich zu <i>lp12_2077</i>
1861	<i>pilL</i>	ähnlich zu <i>lp12_2078</i> und PilL Protein (<i>Vibrio tubiashii</i> ATCC 19109)
1862		ähnlich zu <i>lp12_2079</i>
1863		ähnlich zu <i>lp12_2080</i>
1864		ähnlich zu <i>lp12_2081</i>
1865		ähnlich zu <i>lp12_2082</i>
1866		ähnlich zu <i>lp12_2083</i>
1867		ähnlich zu <i>lpp_2385</i>
1868		ähnlich zu <i>lp12_2085</i>
1869		ähnlich zu <i>lpp2387</i>
1870		ähnlich zu <i>lpp2388</i>
1871		ähnlich zu <i>lpp2389</i>
1872		Exportiertes Membranprotein; ähnlich zu <i>lpp2390</i>
1873		ähnlich zu <i>lpp2391</i>

1874	<i>virB4</i>	Typ IV Sekretionsprotein, VirB4 Komponente, ähnlich zu <i>lpp2392</i>
1875		ähnlich zu <i>lpp2393</i> ; TraU Superfamilie
1876	<i>pilT</i>	Membranprotein, „Tfp pilus assembly, pilus retraction“ ATPase PilT, ähnlich zu <i>lp12_2093</i>
1877		Membranprotein, „TraG-like“ Protein, N-terminal; ähnlich zu <i>lpp_2395</i>
1878		ähnlich zu <i>lp12_2095</i>
1879		ähnlich zu <i>lp12_2096</i>
1880	<i>traD</i>	„Conjugative coupling factor“ TraD, ähnlich zu <i>lp12_2097</i>
1881		ähnlich zu <i>lp12_2098</i>
1882		ähnlich zu <i>lpp2400</i>
1883		ähnlich zu <i>lp12_2101</i>
1884	<i>int</i>	Integrase, putativ; ähnlich zu <i>lp12_2102</i>
1885		ähnlich zu <i>lp12_2103</i>
1886		Antirestriktionsprotein, ähnlich zu <i>lp12_2104</i>
1887		ähnlich zu <i>lpp2408</i>
1888		ähnlich zu <i>lpp2409</i>
-	Repeat	<i>attR-1</i>
2136		TpnA Transposase, ähnlich zu <i>ldg6041</i>
2135		hypothetisches Protein
2134		ähnlich zu <i>GM18_2913</i> (<i>Geobacter</i> sp. M18)
2133		ähnlich zu <i>lpw_25661</i>
2132	<i>traK</i>	TraK Protein, ähnlich zu <i>lpp0067</i>
2131		ähnlich zu <i>lpp2428</i>
2130		ähnlich zu <i>lpw_25801</i> , putativer Dot/Icm Effektor
2129		ähnlich zu <i>lpp2419</i>
2128		ähnlich zu <i>lpc_0225</i> ; <i>lpa_00293</i> , SidC Homolog (<i>L. longbeachae</i> NSW150)
2127		IS652 Transposase, <i>lpp2402</i>
2126		ähnlich zu <i>llo_1617</i>
2125		ähnlich zu <i>lpa_03421</i>
2124		ähnlich zu <i>lpa_03424</i>
2123	<i>int</i>	Prophage CP4-6 Integrase, putativ, ähnlich zu <i>lpa_03425</i>
2122		LysR Transporter Familie, Transkriptionsregulator, ähnlich <i>lpa_03426</i>
2121		ähnlich zu <i>lpa_03427</i>
-	Repeat	<i>attR-2</i>

Tab. 27: Aufbau der genomischen Insel LpcGI-1 bei *L. pneumophila* Corby. Für Gene mit unbekannter Funktion, wurden Gene anderer *Legionella* und „nicht“-*Legionella* Stämme angegeben, die in ihrer Proteinsequenz die höchste Übereinstimmung aufwiesen. *lpc*=*Lp* Corby; *lpp*=*Lp* Paris; *lpg*=*Lp* Phil-I; *lpl*=*Lp* Lens; *lpa*=*Lp* Alcoy; *lpw*=*Lp* 130b; *lp12*=*Lp* ATCC 43250; *llo*=*L. longbeachae* NSW150; *ldg*=*L. drancourtii* LLAP12.

<i>Lpc</i>	Name	Mögliche Funktion bzw. ähnliche Proteine
-	Repeat	<i>attL</i>
2314		ähnlich zu <i>lpg0973</i>
2313		ähnlich zu <i>lpg0974</i>
2312		Transmembranprotein; ähnlich zu <i>lpg0975</i>
2311		Antirestriktionsprotein, ähnlich zu <i>lpg0976</i>
2310		DNA-Einzelstrang bindendes Protein, ähnlich zu <i>ldg_5162</i>
2309		ähnlich zu <i>lpg0978</i>
2308	<i>aacA4</i>	Aminoglykosid N(6') Acetyltransferase, ähnlich zu <i>lpg0979</i>
2307	<i>int</i>	putative Integrase, ähnlich zu <i>lpg0980</i>
2306		ähnlich zu <i>lpa_01497</i>
2305		ähnlich zu <i>ldg_7228</i>
2304		ähnlich zu <i>ldg_7997</i>
2302		ähnlich zu <i>ldg_7231</i>
2301		ähnlich zu <i>ldg_7232</i> ; Acetyltransferase (<i>Acetivibrio cellulolyticus</i> CD2)
2300		ähnlich zu Spectinomycin 3'-Adenylyltransferase (<i>L. longbeachae</i>)
2299		ähnlich zu <i>lgd_7234</i> ; Cyclase-Superfamilie Protein
2298		Acetyltransferase Transporter, GNAT Familie, ähnlich zu <i>ldg_7235</i>
2297		ähnlich zu <i>ldg_7076</i>
2296	<i>traD</i>	„Conjugative coupling factor“ TraD, ähnlich zu <i>lpp1055</i>
2295		ähnlich zu <i>lpp1056</i>
2294		ähnlich zu <i>lpg0985</i>
2293		Membranprotein, „TraG-like“ Protein, N-terminal; ähnlich zu <i>lpg0986</i>
2292	<i>pilT</i>	Membranprotein, „Tfp pilus assembly, pilus retraction“ ATPase, ähnlich zu <i>lpg0987</i>
2291		ähnlich zu <i>lpg0988</i> ; TraU Superfamilie
2290	<i>virB4</i>	Typ IV Sekretionsprotein, VirB4 Komponente, ähnlich zu <i>lpa_01507</i>
2289		ähnlich zu <i>lpl1023</i>
2288		Exportiertes Membranprotein; ähnlich zu <i>lpg0991</i>
2287		ähnlich zu <i>lpp1063</i>
2286		ähnlich zu <i>lpl1026</i>
2285		ähnlich zu <i>lpg0994</i>
2284		ähnlich zu <i>lpl1028</i>
2283		ähnlich zu <i>lpp1067</i>
2282		ähnlich zu <i>lpg0997</i>
2281		ähnlich zu <i>lpp1069</i>
2280		ähnlich zu <i>lpl1032</i>
2279		Exportiertes Protein, putativ; ähnlich zu <i>lpg1000</i>
2278		ähnlich zu <i>lpg1001</i>
2277	<i>pilL</i>	ähnlich zu <i>lpg1002</i> ; PilL Protein (<i>Vibrio tubiashii</i> , ATCC 19109)
2276	<i>lvrC</i>	<i>Legionella vir</i> Region Protein LvrC, ähnlich zu „Carbon storage regulator“, ähnlich zu <i>lpg1003</i>
2275	<i>lvrB</i>	<i>Legionella vir</i> Region Protein LvrB, ähnlich zu <i>lpl1037</i>
2274	<i>lvrA</i>	<i>Legionella vir</i> Region Protein LvrA, ähnlich zu <i>lpg1005</i>
2273	<i>prpA</i>	Phagen Repressor; ähnlich zu <i>lp12_1036</i>
2272		Sekretiertes Protein, putativ; ähnlich zu <i>lpa_01536</i>

2271	<i>helC</i>	Cobalt/Zink/Cadmium Efflux RND Transporter, Außenmembranprotein HelC, ähnlich zu <i>lpa_01537</i>
2270	<i>helB</i>	Kation Effluxsystem HelB, ähnlich zu <i>lpa_01538</i>
2269	<i>helA</i>	Cobalt/Zink/Cadmium Efflux RND Transporter, Permease Protein HelA, ähnlich zu <i>lpa_01539</i>
2268	<i>cada</i>	Cadmium Translokation P-Typ ATPase CadA; ähnlich zu <i>lpa_01540</i>
2267		ähnlich zu <i>lpc_1845</i> , <i>lpa_01544</i>
2266		ähnlich zu <i>lpc_1844</i> , <i>lpa_01547</i>
2265		hypothetisches Protein
2264		ähnlich zu <i>lpa_01548</i>
2263	<i>ctpA</i>	Kation Efflux Transporter, ähnlich zu <i>lpa_01551</i>
2262	<i>cebC</i>	Chemieosmotisches Efflux System B, Protein C, ähnlich zu <i>lpa_01552</i>
2261	<i>cebB</i>	Chemieosmotisches Efflux System B, Protein B, ähnlich zu <i>lpa_01553</i>
2260	<i>cebA</i>	Chemieosmotisches Efflux System B, Protein A, ähnlich zu <i>lpa_01555</i>
2258		Transporterprotein der Metallo-beta Laktamase Familie, ähnlich zu <i>lpa_01556</i>
2257	<i>deoA</i>	Thymidin-Phosphorylase TdRPase, ähnlich zu <i>lpa_01558</i>
2256		Ribose-Phosphat-Pyrophosphokinase, ähnlich zu <i>lpa_01559</i>
2255		ähnlich zu <i>lpa_01560</i>
2254	<i>copA1</i>	Kupfer Efflux ATPase, ähnlich zu <i>lpa_01563</i>
2253	<i>yegE</i>	Sensorbox Protein mit GGDEF/EAL Domäne, ähnlich zu <i>lpa_01565</i>
2252		Außenmembran Lipoprotein, putativ; ähnlich zu <i>lpa_01566</i>
2251	<i>cecC</i>	Chemieosmotisches Efflux System C, Protein C, ähnlich zu <i>lpa_01567</i>
2250	<i>cecB</i>	Chemieosmotisches Efflux System C, Protein B, ähnlich zu <i>lpa_01568</i>
2249		Chemieosmotisches Efflux System C, Protein ähnlich zu Protein A, ähnlich zu <i>lpa_01569</i>
2248	<i>cecA</i>	ähnlich zu <i>lpp2350</i> , Chemieosmotisches Efflux System C, Protein A
2247		ähnlich zu <i>lpa_01573</i>
2246		ähnlich zu <i>lpa_01574</i>
2245		ähnlich zu <i>lpa_01575</i> ; Zytotoxischer translationaler Repressor des Toxin-Antitoxin Systems RelE (<i>Rickettsia felis</i> URRWT Cal2)
2244		ähnlich zu <i>lpa_01576</i>
2243		Kation Efflux System Protein CusA, ähnlich zu <i>lpa_01577</i>
2242		ähnlich zu <i>lpa_01578</i>
2241		ähnlich zu <i>lpa_01579</i>
2240		ähnlich zu <i>lpa_01580</i>
2239		ähnlich zu <i>lpa_01582</i>
2238		ähnlich zu <i>lpp2347</i>
2237		ähnlich zu <i>lpa_01584</i>
2236		ähnlich zu <i>lpg1034</i>
2235	<i>copA2</i>	Kupfer Efflux ATPase, ähnlich zu <i>lpp2345</i>
2234		ähnlich zu <i>lpp2344</i> ; Glu/Leu/Phe/Val Dehydrogenase (<i>Cyanotheca</i> sp. PCC7425)
2233		ähnlich zu <i>lpp2343</i>
2232		ähnlich zu <i>lpp2342</i>
2231		S-Isoprenylcystein Methyltransferase, putativ, ähnlich zu <i>lpp2341</i>
2230		ähnlich zu <i>lpp2340</i>
2229		ähnlich zu <i>lpa_01618</i>
2228		ähnlich zu <i>lpg1043</i>
2227		Oxidoreduktase, FAD-Bindung, ähnlich zu <i>lpa_01621</i>
2226	<i>atpG</i>	ATP Synthase, Untereinheit Gamma, C-Terminus, ähnlich zu <i>lpg1047</i>
2225		ATP Synthase, F1-Untereinheit Alpha, ähnlich zu <i>lpg1048</i>
2224		ähnlich zu <i>lpa_01626</i> , ATP Synthase Untereinheit B
2223		ähnlich zu <i>lpa_01627</i> , ATP Synthase, Untereinheit C

2222		ATP Synthase, Untereinheit A, ähnlich zu <i>lpp2331</i>
2221		ähnlich zu <i>lpa_01630</i> , ATP Synthase Protein I
2220		ähnlich zu <i>lpa_01631</i> , ATP Synthase, Untereinheit Epsilon
2219	<i>atpD</i>	ATP Synthase F1 Untereinheit Beta, ähnlich zu <i>lpg1054</i>
2218		ähnlich zu <i>lpa_01634</i>
2217		ähnlich zu <i>lpw10991</i>
2216	<i>phbC</i>	Polyhydroxyalkanoat Synthase, ähnlich zu <i>lpp2323</i>
2215	<i>phaB</i>	Acetoacetyl CoA Reduktase, ähnlich zu <i>lpg1059</i>
2214		Transporterprotein, „cold shock domain family transporter protein“, ähnlich zu <i>lpg1060</i>
2213		ähnlich zu <i>lpg1061</i>
2212		TRP-Repeat Protein, ähnlich zu <i>lpg1062</i>
2211	<i>proP6</i>	Prolin/Betain Transporter ProP6, ähnlich zu <i>lpg1063</i>
2210		Polypeptid Deformylase, ähnlich zu <i>lpg1064</i>
2209		ähnlich zu <i>lpa_01653</i> , putatives „FlgJ-like“ Protein
2208		ähnlich zu <i>lpa_01654</i> , Transkriptionsfaktor
2207		ähnlich zu <i>lpg1067</i>
2206		Prophage Regulator Protein, ähnlich zu <i>lpg1068</i>
2205		AbiD, Phage Protein, ähnlich zu <i>lpa_01657</i>
2204	<i>int</i>	Integrase, „Phage related“, ähnlich zu <i>lpa_01658</i>
-	Repeat	<i>attR-1</i>
2203		ähnlich zu <i>lpa_01659</i>
2202		ähnlich zu <i>lpa_01661</i>
2201		ähnlich zu <i>lpa_01665</i>
2200		ähnlich zu <i>lpa_01666</i> , P-loop ATPase
2199		Repeat Region, TP1
2198		ähnlich zu <i>lpa_01666</i> , P-loop ATPase
2197		Repeat Region, TP2
2196		ähnlich zu <i>lpa_01668</i>
2195		Innenmembranprotein; ähnlich zu <i>lpa_01670</i> ; DNA/RNA Helikase Superfamilie II (<i>Fraterulia aurantia</i> DSM6220)
2194		ähnlich zu <i>lpa_01671</i>
2193		ähnlich zu <i>lpa_01672</i>
2192		ähnlich zu <i>lpa_01673</i> ; DNA Bindedomäne Protein, Exzisionase Familie (<i>Cupriavidas taiwanensis</i>)
2191		ähnlich zu <i>lpa_01674</i>
2190	<i>int</i>	Integrase, „Phage related“, ähnlich zu <i>lpl1085</i>
-	Repeat	<i>attR-2</i>

Tab. 28: Aufbau der genomische Insel LpcGI-Asn bei *L. pneumophila* Corby. Für Gene mit unbekannter Funktion, wurden Gene anderer *Legionella* und „nicht“-*Legionella* Stämme angegeben, die in ihrer Proteinsequenz die höchste Übereinstimmung aufwiesen. *lpc*=Lp Corby; *lpp*=Lp Paris; *lpa*=Lp Alcoy.

lpc	Name	Mögliche Funktion bzw. ähnliches Protein
-	Repeat	<i>attL</i>
0091		ähnlich zu <i>lpa_00113</i>
0090		ähnlich zu <i>lpa_00112</i>
0089		hypothetisches Protein
0088	<i>lvrA</i>	<i>Legionella vir</i> Region Protein LvrA; ähnlich zu <i>lpa_00111</i> ; <i>lpp0075</i>
0087		ähnlich zu <i>lpp0074</i> ; <i>lpa_00110</i> ; putative Antitoxin Komponente (<i>Vibrio scophthalmi</i>)
0086		ähnlich zu <i>lpp0073</i> ; <i>lpa_00109</i> ; putative Toxin Komponente (<i>Vibrio scophthalmi</i>)
0085	<i>int</i>	Integrase, „Phage related“; ähnlich zu <i>lpa_00108</i> ; <i>lpp0072</i>
-	Repeat	<i>attR</i>

Tab. 29: Aufbau der genomische Insel LpcGI-Phe bei *L. pneumophila* Corby. Für Gene mit unbekannter Funktion, wurden Gene anderer *Legionella* und „nicht“-*Legionella* Stämme angegeben, die in ihrer Proteinsequenz die höchste Übereinstimmung aufwiesen. *lpc*=Lp Corby; *lpa*=Lp Alcoy.

lpc	Name	Mögliche Funktion bzw. ähnliches Protein
-	Repeat	<i>attL</i>
1384		TpnA Transposase; ähnlich zu <i>lpc2136</i>
1385		ähnlich zu <i>lpa_02790</i>
1386		ähnlich zu <i>lpa_02791</i>
1387		ähnlich zu <i>lpa_09792</i>
1388		Transposase/IS-Protein, Insertionssequenz IS5376, ATP-bindendes Protein
1389		IS5376 Transposase, putativ; ähnlich zu <i>plpp0020</i>
1390		ähnlich zu <i>lpa_02792</i>
1391	<i>int</i>	putative Integrase; ähnlich zu <i>lpa_02795</i>
1392		Innenmembranprotein; ähnlich zu <i>lpa_02796</i>
1393		ähnlich zu <i>lpa_02798</i>
1394		ähnlich zu <i>Trg7_2943</i> (<i>Thioalkalivibrio sulphidophilus</i>)
1395	<i>int</i>	Integrase, „Phage related“; ähnlich zu <i>lpa_02800</i>
-	Repeat	<i>attR</i>

Tab. 30: Liste der bisher sequenzierten *Legionella* Stämme und der jeweiligen Accession-Nummern, unter der, die Genome in den Gendatenbanken hinterlegt wurden.

Stamm	Genbezeichnung	Accession Nummer
<i>L. pneumophila</i> Philadelphia-I	lpg	AE017354
<i>L. pneumophila</i> Paris	lpp	CR628336
<i>L. pneumophila</i> Lens	lpl	CR628337
<i>L. pneumophila</i> Corby	lpc	CP000675.2
<i>L. pneumophila</i> Alcoy	lpa	CP001828
<i>L. pneumophila</i> 130b	lpw	ERA011231
<i>L. pneumophila</i> Lorraine	lpo	FQ958210
<i>L. pneumophila</i> subs. <i>pneumophila</i> ATCC 43250	lp12	CP003192
<i>L. longbeachae</i> NSW150	llo	FN650140
<i>L. longbeachae</i> D-4968	llb	ACZG00000000
<i>L. drancourtii</i> LLAP12	ldg	ACUL00000000

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACEC	N-(2-Acetamido)-2-aminoethansulfonsäure
ad	auffüllen auf
Amp	Ampicillin
att	attachment sites, Verbindungs- oder Rekombinationsstellen
BCYE	Buffered Charcoal Yeast Extract
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaCl₂x2H₂O	Calciumchlorid-Dihydrat
°C	Grad Celsius
CFU	„colony forming unit“, Koloniebildende Einheit
CO₂	Kohlendioxid
dA	Desoxyadenosin
dC	Desoxycytidin
dG	Desoxyguanosin
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dT	Desoxythymidin
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
et al.	et altera, und Andere
EtOH	Ethanol
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat
F	Farad
FCS	fetal calf serum, Fetales Kälberserum
Fe(NH₄)₂(SO₄)₂x6H₂O	Ammoniumeisen(II)-sulfat
Fe₄NO₃	Eisen(III)-nitrat
Fe₄(P₂O₇)₃	Eisen(III)-pyrophosphat
g	Gramm
h	hour(s), Stunde(n)
H₂O_{dd}	bidestilliertes Wasser
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KH₂PO₄	Kaliumdihydrogenphosphat
Km	Kanamycin
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter

LB	Luria Bertani
M	Molar
mA	Milliampere
Mb	„millions of base pairs“
µg	Mikrogramm
MgCl₂	Magnesiumchlorid
MgSO₄x7H₂O	Magnesiumsulfat
min	Minute(n)
mind.	mindestens
ml	Milliliter
µm	Mikrometer
NaAc	Natriumacetat
NaCitrat	Natriumcitrat
NaCl	Natriumchlorid
NH₄	Ammonium
Na₂HPO₄x7H₂O	Disodiumhydrogenphosphat
ng	Nanogramm
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerase Kettenreaktion
PYG	Peptone Yeast Extract Glucose
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RPMI	Zellkulturmedium, abgeleitet von Roswell Park Memorial Institute
qPCR	quantitative PCR
sec	Sekunde(n)
Sm	Streptomycin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TK	Transkonjuganten
u. a.	unter anderem
ÜN-Kultur	Übernachtkultur
V	Volt
vgl.	vergleiche
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
YEB	Buffered Yeast Extract
z. B.	zum Beispiel
Ω	Ohm
%	Prozent

Publikationsliste

Forschungsartikel

Eylert, E., Herrmann, V., Jules, M., Gillmaier, N., **Lautner, M.**, Buchrieser, C., Eisenreich, W., Heuner, K. (2010). Isotopologue Profiling of *Legionella pneumophila* – Role of Serine and Glucose as Carbon Substrates. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 22232 – 22243.

Lautner, M., Schunder, E., Herrmann, V., Heuner, K. (2012). Regulation, Integrase-dependent Excision and Horizontal Transfer of Genomic Islands in *Legionella pneumophila*. (submitted)

Konferenzbeiträge

Posterpräsentationen

Monika Lautner, Christine Ott, Klaus Heuner. The Trb/Tra conjugation/type IVA secretion system of *Legionella pneumophila* Corby. *Legionella*, 2009

Monika Lautner, Christine Ott, Klaus Heuner. Genomic islands of *Legionella pneumophila* Corby. Gemeinsame Jahrestagung der VAAM und DGHM, 2010

Monika Lautner, Vroni Herrmann, Kerstin Rydzewski, Klaus Heuner. Genomic islands of *Legionella pneumophila* Corby. Jahrestagung der DGHM, 2011

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein außerordentlicher Dank gilt in erster Linie Herrn PD Dr. Klaus Heuner, der mir die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit gab, für die hervorragende Betreuung, sein stetes Interesse am Fortgang meiner Arbeit und seine allzeit vorhandene Diskussionsbereitschaft.

Frau Prof. Dr. Antje Flieger möchte ich für die Betreuung dieser Arbeit von Seiten des Robert Koch-Instituts, Wernigerode und Herrn Prof. Dr. Thomas Eitinger für die Betreuung von Seiten der Humboldt-Universität zu Berlin danken.

Ein besonders großes Danke, möchte ich hiermit meinen ehemaligen Kollegen der früheren Arbeitsgruppe P26 am Robert Koch-Institut, Berlin aussprechen. Für das tolle Arbeitsklima und die allzeit vorhandene Hilfsbereitschaft danke ich Eva Schunder, Tino Schulz, Vroni Herrmann, Yvonne Matern, Nicole Janitzek, David Wagner Dr. Susanne Behrens-Kneip und Kerstin Rydzewski.

Einen herzlichen Dank, möchte ich auch allen hilfsbereiten Mitarbeitern der Service-Einheiten des Robert Koch-Instituts aussprechen.

Von ganzem Herzen möchte ich meinen Eltern danken, die mich bisher bei all meinen Zielen unterstützt haben und immer für mich da waren.

Erklärung

Gemäß §7 der Promotionsordnung der Humboldt-Universität zu Berlin, erkläre ich hiermit an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbst und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer darstellt und die benutzten Hilfsmittel und sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Monika Lautner

Berlin, 25. September 2012